



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR
LEISHMANIA INFANTUM EM GATOS DOMÉSTICOS E ERRANTES NOS DISTRITOS
DE LISBOA E VISEU

Joana Margarida da Cruz Baptista Galvão Garrido

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

Doutora Isabel Maria Pereira Soares Pereira de
Fonseca de Sampaio

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADOR

Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

CO-ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Pereira Soares Pereira
de Fonseca de Sampaio

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR
LEISHMANIA INFANTUM EM GATOS DOMÉSTICOS E ERRANTES NOS DISTRITOS
DE LISBOA E VISEU

Joana Margarida da Cruz Baptista Galvão Garrido

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

Doutora Isabel Maria Pereira Soares Pereira de
Fonseca de Sampaio

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADOR

Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

CO-ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Pereira Soares Pereira
de Fonseca de Sampaio

2012

LISBOA

*“...Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões
e períodos de crise.*

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história...”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Paulo Sales Luís, agradeço-lhe por todo o conhecimento transmitido, boa disposição e simpatia. Um muito obrigado por me ter dado a oportunidade de estagiar consigo e pela amizade desenvolvida!

À Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca, por todo o apoio, dedicação, simpatia e amizade. Um enorme obrigado por estar sempre disposta a ajudar mesmo nos momentos em que tudo parece impossível.

À Professora Doutora Ana Duarte e à equipa fantástica com quem tive o prazer de trabalhar no laboratório de Virologia da FMV-UTL por toda a simpatia, perseverança, apoio e amizade.

À Dra. Ana Carvalho, um grande obrigada por todas as boas conversas, por todos os bons momentos partilhados e por todo o conhecimento transmitido.

Aos meus Pais, à Dinha e ao Carlos...devo-vos tudo o que sou e tudo o que sempre conquistei! Sem vocês não teria chegado aqui..O maior obrigada é para vocês!

Ao irmão mais lindo, Filipe...és o meu orgulho!

À minha tia Ethel por todo o apoio enquanto estava no Canadá...um grande obrigada!

Ao Dr. Rui Louro da Clínica Veterinária Vetlírrios, à Dra. Cármen Rosa e à Associação Animais de Rua, ao Dr. Abel Fernandes e ao SoSAnimal Viseu, ao Dr. Hélder Rodrigues e ao Hospital Veterinário Tutti-Natura, à Dra. Ana Vaz e ao Cantinho dos Animais Abandonados de Viseu por me fornecerem parte das amostras para a parte prática desta tese.

À Doutora Carla Maia pela disponibilização de alguns documentos imprescindíveis para esta tese. Ao Dr. Jorge Moreira da Virbac pelo fornecimento dos medicamentos para a execução de uma componente da parte prática deste estudo. Ao Mestre Jacinto Gomes do LNIV/INRB pela cedência de um soro de gato positivo, utilizado como controlo na técnica de Imunofluorescência Indirecta. Ao Professor Doutor Telmo Nunes pela disponibilidade e ajuda na parte estatística desta dissertação.

À Dra. Lúdia Gomes por todo o conhecimento laboratorial transmitido.

À Dra. Ana Paula Cambeta, por todo o conhecimento partilhado ao longo destes anos, pelos bons momentos na sua companhia e pela amizade que conquistamos.

À Ana San-Bento, Sara Reis e Ana Azinheira...que fazem da minha vida um arco-íris com mil cores...Porque afinal o que é que me faz feliz? Ser uma Brava!!

À minha Keláudia, este curso sem ti não teria o mesmo encanto. Ao Luís, “obrigada por me continuares a cativar!” À minha Joaquina, por me teres acompanhado desde o início de tudo sempre com um mega sorriso e um mimiinho. À Andreia, minha companheira de estágios, obrigada pela amizade, apoio, sorrisos, parvoíces, palavras com/sem sentido e momentos inigualáveis...vais ser uma grande veterinária! Ao Ângelo, pelas palavras amigas, pelo apoio e pela ajuda imprescindível no final da tese.

À minha família açoriana quero deixar algumas palavras...David espero que tenhas aprendido como descascar laranjas e a fazer brincos no forno. Gonçalo nunca vou esquecer o nosso Carnaval de 2007. Sofi...”Que FOFY!!!!”...é como te descrevo. Tânia, a dança fica-te bem, vou lembrar-me sempre das nossas noitadas no BA. Cláudia...deste-me a alegria de ser a madrinha da coisa mais fofa de sempre, a nossa Mel. Ed...sempre que me lembrar de ti, vou lembrar-me dos Biscouutos. Telma, mulher poderosa e humilde, obrigado por te teres integrado! A todos...desejo-vos o melhor do mundo, vou guardar com muito carinho os nossos 5 anos em conjunto, especialmente aqueles 2 que só nós é que sabemos!

To all members of the Ottawa Veterinary Hospital, thank you all for giving me the opportunity to join a clinical staff so special as yours. Thanks for all the knowledge shared and for all the goods moments. I really enjoy it!

À minha Princesa!

Por fim, quero pedir a todos os meus colegas que façam sempre o melhor que conseguirem pelos nossos animais!

RESUMO

Contribuição para o estudo da prevalência da infecção por *Leishmania infantum* em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu

A Leishmaniose visceral zoonótica causada por *Leishmania infantum* é considerada uma doença endémica no nosso País. Sabe-se que o cão é o principal hospedeiro reservatório, no entanto, o papel do gato (*Felis catus*) na epidemiologia da doença têm vindo adquirir um interesse crescente.

A presente dissertação baseia-se em um rastreio epidemiológico da infecção por *Leishmania infantum* em gatos dos distritos de Lisboa e Viseu. A amostra total foi de 80 gatos correspondendo 40 animais a cada área geográfica em estudo. Cada um desses 40 animais foram distribuídos equitativamente por 2 grupos: um de gatos domésticos e outro de gatos errantes. Foram utilizados dois métodos para o diagnóstico de infecção por *L. infantum* nos gatos, um serológico (Imunofluorescência Indirecta - IFI) que permite avaliar a resposta imunitária à infecção pelo parasita e outro molecular (Reacção em Cadeia da Polimerase em tempo real - qPCR) que mostra a presença de ADN do protozoário. Pela técnica de IFI, 15 (16,8%) animais foram positivos na diluição 1:40 e pela técnica de qPCR 8 (11,3%) gatos revelaram resultados positivos (com carga parasitária entre 100 a 500 cópias de moléculas de plasmídeo). Nos quatro grupos estudados, as seroprevalências encontradas, através da técnica de IFI, foram para a Área Metropolitana de Lisboa: 20% (4/20) para os animais domésticos e 5% (1/20) para os errantes enquanto que para os dois grupos de Viseu, ambos apresentaram a percentagem de 25% (5/20). Através da técnica de qPCR as prevalências obtidas foram de 10% (2/20) para todos os grupos estudados. Neste estudo foi avaliada, apenas nos animais positivos em qualquer das técnicas, a possível associação entre a presença dos vírus imunossupressores (FIV e FeLV) e a positividade para a infecção por *Leishmania* spp, tendo-se obtido um gato seropositivo para FIV e dois gatos positivos a antígeno de FeLV. Estes dados mostram a ausência de uma associação estatisticamente significativa ($p > 0,005$)

A prevalência da infecção por *Leishmania* spp. e a Lfel tem vindo a aumentar em Portugal pelo que os proprietários devem ser alertados assim como e os médicos veterinários devem estar atentos para esta nova realidade.

Palavras chaves: gato, *Leishmania infantum*, rastreio, Área Metropolitana de Lisboa, Viseu

ABSTRACT

Contribution for the study of the prevalence of *Leishmania infantum* infection in domestic cats and wandering in the districts of Lisbon and Viseu

Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is considered an endemic disease in Portugal. The dog is known to be the main reservoir host, however, the role of the cat (*Felis catus*) in the disease's epidemiology has been acquiring a increasing interest.

The current dissertation is based on an epidemiological screening of *Leishmania infantum* infection in cats in the in the areas of Lisbon and Viseu. The total sample consisted of 80 cats corresponding to 40 animals in each geographical area of study. Each of these 40 animals were distributed equitably by 2 groups: one of domestic cats and the other of stray cats. For the diagnosis of infection with *L. infantum* in cats, 2 methods were used, a serological (Indirect Immunofluorescence - IFI) and a molecular survey (Polymerase Chain Reaction in real-time - qPCR). Through the IFI technique, 15 (16,8%) animals were positive in the *cut-off* 1:40 and By qPCR 8 (11,3%) cats showed positive results (with parasite burden between 100 to 500 copies of plasmids molecules). For the 4 groups, the seroprevalence found through the IFI technique, for the Lisbon Metropolitan Area: 20% (4/20) for the domestic cats and 5% (1/20) for the stray ones and for two groups of Viseu both presented the same value 20% (5/20). According to the qPCR technique the prevalence obtained was 10% (2/20) for all groups studied.

In this study, we also evaluated the possibility of an association between the presence of suppressive virus (FIV and FeLV) and positivity for the infection by *Leishmania* spp. only in the positive animals for infection by the parasite. The obtained results one seropositive cat for FIV and two positive cats for FeLV, showing a statistically significance for both virus of $p > 0,005$, reveals the absence of a statistic association. The prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats and Feline Leishmaniasis is increasing in our country so owners and veterinarians should be alerted for this new reality.

Key words: Cat, *Leishmania infantum*, screening, Lisbon Metropolitan Area, Viseu

DIVULGAÇÃO DE RESULTADOS DO PRESENTE TRABALHO EM CONGRESSOS CIENTÍFICOS

1- Garrido, J., Sales Luís, J., Duarte, A., Tavares, L., Pereira da Fonseca, I. Comparação do quadro da infecção por *Leishmania infantum* em gatos domésticos e errantes provenientes dos distritos de Viseu e Lisboa. XVI Congresso da Sociedade Portuguesa de Parasitologia. Lisboa, 29 e 30 de Novembro de 2012. Comunicação oral (Resumo no Anexo VII).

2- Garrido, J., Sales Luís, J., Duarte, A., Tavares, L., Pereira da Fonseca, I. Sabia que existe infecção por *Leishmania infantum* em gatos domésticos e errantes em Viseu? IX Congresso Hospital Veterinário Montenegro: Medicina e Cirurgia Felina. Santa Maria da Feira, 23 e 24 de Fevereiro de 2013. Comunicação em painel.

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO I – ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS	1
1. Introdução	1
2. Instituto Veterinário do Parque (IVP)	1
3. Descrição das actividades desenvolvidas no IVP e respectiva casuística	2
a. Área clínica	2
b. Área cirúrgica	4
c. Exames complementares de diagnóstico.....	5
d. Outras actividades desenvolvidas	6
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
1. Leishmaniose.....	7
1.1 Agente Etiológico: Leishmania spp.	7
1.2 Hospedeiros Invertebrados.....	11
1.3 Hospedeiros Vertebrados	13
2. Ciclo Biológico	14
2.1 Desenvolvimento no Hospedeiro Invertebrado	14
2.2 Desenvolvimento no Hospedeiro Vertebrado	14
3. Vias de transmissão/ Vias de infecção	16
4. Susceptibilidade à infecção/ Factores de Risco.....	17
5. Epidemiologia	18
5.1. Leishmaniose Felina em Portugal.....	23
6. Patogenia e Lesões	25
7. Diagnóstico	27
7.1. Quadro Clínico.....	27
7.2. Diagnóstico Laboratorial	30
7.2.1. Observação morfológica do parasita	30
7.2.2. Detecção de anticorpos anti-Leishmania.....	31
7.2.2.1. Técnica de Imunofluorescência Indirecta (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	
.....	33
7.2.3. Detecção de ADN de Leishmania	35
7.2.3.1. Técnicas de PCR-RFLP e qPCR	36
7.2.4. Outras Técnicas de Diagnóstico.....	37
7.2.4.1. Isolamento e culturas in vivo e in vitro de Leishmania spp.	37
7.2.4.2. Xenodiagnóstico.....	38
7.2.4.3. Western Blot – WB	39
7.2.4.4. Teste de Aglutinação Directa – TAD.....	39
8. Tratamento	39

9. Profilaxia.....	42
10. Importância em Saúde Pública.....	42
CAPITULO III- CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> EM GATOS DOMÉSTICOS E ERRANTES NOS DISTRITOS DE LISBOA E VISEU.....	44
1. Objectivos	44
2. Introdução	44
3. Material e Métodos	47
3.1. Caracterização da Amostra.....	47
3.2. Colheita e conservação do material biológico	48
3.3. Métodos de diagnóstico e respectivos protocolos	49
3.3.1. Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania infantum</i> pela técnica de Imunofluorescência Indirecta (IFI)	49
3.3.1.1. Avaliação da hemólise e possível influência na técnica IFI	51
3.3.2. Detecção de ADN de <i>Leishmania infantum</i> através da técnica molecular de PCR em tempo real (qPCR).....	51
3.3.3. Detecção de anticorpos contra o Vírus da Imunodeficiência Felina	55
3.3.4. Detecção de antígeno do Vírus da Leucemia Felina	55
3.4. Métodos Estatísticos	57
4. Resultados.....	57
4.1. Caracterização dos animais da amostra.....	57
4.1.1. Sexo dos animais da amostra	57
4.1.2. Idade dos animais da amostra.....	58
4.1.3. Raça e tipo de pelagem dos animais da amostra	59
4.1.4. Proveniência dos animais da amostra.....	59
4.1.5. Caracterização do habitat dos animais da amostra	60
4.2. Resultados obtidos nos inquéritos realizados aos proprietários dos felinos domésticos de Lisboa e Viseu	61
4.3. Resultados obtidos na pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> pela técnica de IFI.....	62
4.4. Resultados obtidos na pesquisa de ADN de <i>Leishmania</i> pela técnica de qPCR	64
4.5. Resultados da detecção de anticorpos anti-FIV e antígeno de FeLV nas amostras positivas a <i>Leishmania</i> pelas técnicas de IFI e qPCR.....	65
4.6. Resultados da análise estatística efectuada.....	66
4.7. Limitações do estudo.....	68
5. Discussão	69
IV - CONCLUSÃO.....	79
V - BIBLIOGRAFIA	81
V – ANEXOS.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colheita das amostras de sangue.....	6
Figura 2. Representação ilustrativa das formas promastigota (A) e amastigota (B)	9
Figura 3. Aspecto da forma promastigota (A) e de formas amastigotas (B) no interior de macrófagos de cão.....	9
Figura 4. <i>Phlebotomus perniciosus</i> macho.....	12
Figura 5. Resumo ilustrativo do ciclo de vida de <i>Leishmania infantum</i>	15
Figura 6. Casos de Lfel reportados a nível mundial.	20
Figura 7. Nódulo cutâneo na região da cabeça (seta) antes da sua extirpação	23
Figura 8. Esfregaço de sangue de um gato diagnosticado com Lfel. Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> presentes no interior de neutrófilos (seta) (Ampliação: 500x).....	23
Figura 9. Nódulos cutâneos nos pavilhões auriculares de um gato com Lfel.....	27
Figura 10. Lesões dermatológicas de um gato com Lfel	28
Figura 11. Crostas, pápulas, despigmentação e eritema da trufa de um gato com Lfel.....	29
Figura 12. Uveíte e coágulo de fibrina na câmara anterior do olho esquerdo de um gato com Lfel (seta)	29
Figura 13. Queratite em um gato: Secção evidenciando um elevado número de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> (seta) no interior do citoplasma de numerosos macrófagos. IHC.	31
Figura 14. Gato doméstico diagnosticado com Lfel no dia do diagnóstico (A) e 29 dias após tratamento com Alopurinol (B)	41
Figura 15. Mapa de Portugal Continental evidenciando os distritos onde foi efectuado o estudo epidemiológico	45
Figura 16. Material utilizado para a realização da técnica de IFI.	51
Figura 17. Caracterização macroscópica do estado de hemólise dos soros.....	51
Figura 18. Resumo ilustrativo da técnica de ELISA do teste ViraCHEK®/FIV.....	55
Figura 19. Resumo ilustrativo da técnica de ELISA do teste ViraCHEK®/FeLV.....	56
Figura 20. Teste ViraCHEK®/FIV e ViraCHEK®/FeLV com um resultado positivo a FIV.	56
Figura 21. Aspecto de várias amostras pela técnica de IFI de <i>Leishmania</i> , titulação 1:40.	63
Figura 22. Resultados da electroforese a que foram submetidas as amostras que obtiveram amplificação do produto.....	65
Figura 23. Gato Errante de Viseu com resultado positivo para FIV.....	65
Figura 24. Teste ViraCHEK®/FIV com um resultado positivo (A) evidenciando o controlo positivo (CP) e o negativo (CN).	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das consultas por especialidade	3
Tabela 2. Frequências absoluta e relativa dos exames complementares de diagnóstico observados	5
Tabela 3. Espécies do género <i>Leishmania</i> e os seus respectivos hospedeiros reservatórios, distribuição geográfica e vectores.....	8
Tabela 4. Seroprevalências de estudos sobre a infecção por <i>Leishmania infantum</i> em gatos no Sul da Europa entre 2002 e 2010.....	21
Tabela 5. Sumário das várias técnicas de diagnóstico de Leishmaniose/ infecção por <i>Leishmania</i> e as suas respectivas vantagens e desvantagens	37
Tabela 6. Resumo de alguns fármacos utilizados no tratamento da Leishmaniose, o seu mecanismo de acção e os respectivos efeitos adversos e eficácia.....	40
Tabela 7. Representação gráfica da proveniência das amostras dos gatos.....	48
Tabela 8. Diluições seriadas do <i>standard</i> e os respectivos valores Ct.	54
Tabela 9. Representação das diversas fases de amplificação de ácidos nucleicos pela técnica de PCR em tempo real.	54
Tabela 10. Distribuição da amostra de gatos domésticos de Viseu e Lisboa por idades.....	58
Tabela 11. Proveniência dos animais domésticos de Viseu e Lisboa.....	60
Tabela 12. Representação das Frequências Absolutas e Relativas dos tipos de habitat dos felinos domésticos de Lisboa e Viseu.	61
Tabela 13. Frequências absolutas e relativas dos resultados do inquérito efectuado aos proprietários dos gatos domésticos de Lisboa e Viseu.	61
Tabela 14. Seroprevalências obtidas pela técnica de IFI (diluição 1:40) nos diferentes grupos analisados (nº de indivíduos/ grupo = 20).	63
Tabela 15. Resultados da comparação entre os grupos dos animais da amostra e as técnicas de diagnóstico realizadas.	67
Tabela 16. Resultados estatísticos obtidos para os gatos testados para FIV e FeLV.	68

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição dos animais de acordo com a espécie	2
Gráfico 2. Distribuição do nº de animais por idade e espécie	3
Gráfico 3. Distribuição dos animais por tipo de cirurgia, espécie e género animal	5
Gráfico 4. Média das temperaturas máximas e mínimas registadas nas cidades de Viseu e Lisboa desde Janeiro de 2011 a Junho de 2012.....	47
Gráfico 5. PCR em tempo real com as curvas <i>standard</i> das diluições seriadas e os seus respectivos valores Ct.....	54
Gráfico 6. Distribuição dos animais da amostra por grupo e por sexo.....	58
Gráfico 7. Distribuição dos gatos da amostra por raça (n=80).	59
Gráfico 8. Resultados do qPCR de <i>Leishmania</i> com amplificação de duas amostras positivas (A e B), tendo A uma réplica e ausência de amplificação de quatro amostras (C).	64

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I – Inquérito realizado aos proprietários dos felinos domésticos de Lisboa e Viseu	93
Anexo II - Resultados de todos os exames de diagnóstico às quais foram submetidas as amostras dos gatos errantes e domésticos de Lisboa.....	95
Anexo III - Resultados de todos os exames de diagnóstico às quais foram submetidas as amostras dos gatos errantes e domésticos de Viseu.	96
Anexo IV - Resultados Estatísticos aplicados à técnica de IFI.....	97
Anexo V - Resultados Estatísticos aplicados à técnica de qPCR	97
Anexo VI - Informação relativa dos gatos com resultados positivos nas técnicas de IFI e qPCR.	98
Anexo VII – Resumo para o XVI Congresso da Sociedade Portuguesa de Parasitologia.....	99

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C graus Celsius

= igual

≥ maior ou igual

< menor

> maior

fi frequência absoluta

% percentagem

μL microlitro

μM micromolar

Ac anticorpo

Ac/Ag Complexo Anticorpo/Antigénio

ADN Ácido desoxirribonucleico

Ag antigénio

AML Área Metropolitana de Lisboa

BID duas vezes ao dia

CD glicoproteína de superfície de linfócitos e outras células imunitárias (“cluster of differentiation”)

CP Carga Parasitária

ECG electrocardiograma

e.g. por exemplo (*exempli gratia*)

EUA Estados Unidos da América

ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FeLV Vírus da Leucemia Felina (“Feline Leukemia Virus”)

FMV – UTL Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa

FIV Vírus da Imunodeficiência Felina (“Feline Immunodeficiency Virus”)

GDL Grupo Domésticos de Lisboa

GDV Grupo Domésticos de Viseu

GEL Grupo Errantes de Lisboa

GEV Grupo Errantes de Viseu

GP63 Glicoproteína 63

HE Hematoxilina/ Eosina

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

ICQ Imunocitoquímica

IFI Imunofluorescência indirecta

IFN Interferão

IgG Imunoglobulina G

IHMT Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Universidade Nova de Lisboa)

IHQ Imunohistoquímica

IL interleucina

IM via intramuscular

IRC/ DRC insuficiência renal crónica/ doença renal crónica

IV via endovenosa

IVP Instituto Veterinário do Parque

kADN ADN do cinetoplasto

kg quilograma

km² quilómetros quadrados

LAV Leishmaniose antroponótica visceral

Lcan Leishmaniose canina

Lfel Leishmaniose felina

LPG Lipofosfoglicano

LC Leishmaniose cutânea

Lhum Leishmaniose humana

LMC Leishmaniose mucocutânea

LV Leishmaniose visceral

LVZ Leishmaniose visceral zoonótica

mg miligrama

MHC Complexo Maior de
Histocompatibilidade (“Major
Histocompatibility Complex”)
MIMV Mestrado Integrado em Medicina
Veterinária
mL mililitro
nº número
ng nanogramas
PBS Tampão fosfato-salino (“Phosphate
buffered saline”)
PCR Reacção em cadeia da polimerase
 (“Polymerase chain reaction”)
PIF Peritonite Infecciosa Felina
PO via oral (*per os*)

qPCR Reacção em cadeia da polimerase
em tempo real (“Real Time Polymerase
Chain Reaction”)
RFLP Polimorfismo do Tamanho do
Fragmento de Restrição (“Restriction
Fragment Length Polymorphism”)
SID uma vez ao dia
TAD teste de aglutinação directa (“Direct
Agglutination Test”)
Th células T efectoras (T helper cell)
TID três vezes ao dia
TNF Factor de Necrose Tumoral (“tumor
necrosis factor”)
vs versus
WB Western Blot

CAPÍTULO I – ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS

1. Introdução

O curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) é constituído por onze semestres de componente lectiva e termina num último semestre de componente prática, o estágio curricular.

O estágio curricular do MIMV foi realizado no Instituto Veterinário do Parque (IVP), nos laboratórios da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL) de Parasitologia e Doenças Parasitárias e de Virologia. Teve início no dia 5 de Setembro de 2011 e terminou no dia 31 de Janeiro de 2012, sob a orientação do Professor Doutor José Paulo Sales Luís e com a co-orientação da Professora Doutora Isabel Pereira de Fonseca.

A escolha do Instituto Veterinário do Parque para local de estágio está relacionada com as áreas de interesse da autora - Medicina Interna e Cirurgia - de animais de companhia. No entanto, a sua atenção recai na interacção entre a Parasitologia e a Medicina Interna. O tema prende-se com o particular interesse no paciente felino e consiste numa simbiose de várias áreas em Medicina Veterinária como a Parasitologia, a Medicina Interna e a Saúde Pública.

2. Instituto Veterinário do Parque (IVP)

O IVP é uma clínica médico-veterinária localizada na cidade de Lisboa, na Rua Castilho e é dirigida pelo Professor Doutor José Sales Luís, que conta com o auxílio da Sra. Dra. Ana Paula Carvalho e de duas funcionárias. A clínica é constituída por dois consultórios (onde são realizados electrocardiogramas (ECG) e ecografias), várias salas sendo uma de cirurgia, uma de internamento, outra de banhos e tosquias com um espaço de recepção e ainda uma sala de espera. O horário de atendimento ao público é de segunda a sexta, das 11 horas às 13 horas e das 15 horas às 20 horas e nos sábados das 10 horas às 13 horas. O período compreendido entre as 13 horas e as 15 horas dos dias úteis, por ser uma altura sem movimento na clínica, permite a realização de cirurgias.

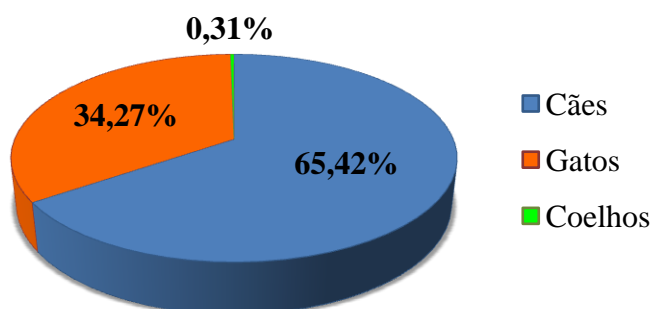
3. Descrição das actividades desenvolvidas no IVP e respectiva casuística

a. Área clínica

Assim que inicia o período de estágio curricular no IVP, o estagiário passa a ser parte integrante do corpo clínico da clínica. No âmbito da clínica médica este tem a oportunidade de participar em consultas - acompanhamento e contenção dos animais para a realização de procedimentos médicos, proceder a administração de fármacos e colheita de sangue para análises clínicas ou teste rápidos de diagnóstico bem como a realização de electrocardiogramas.

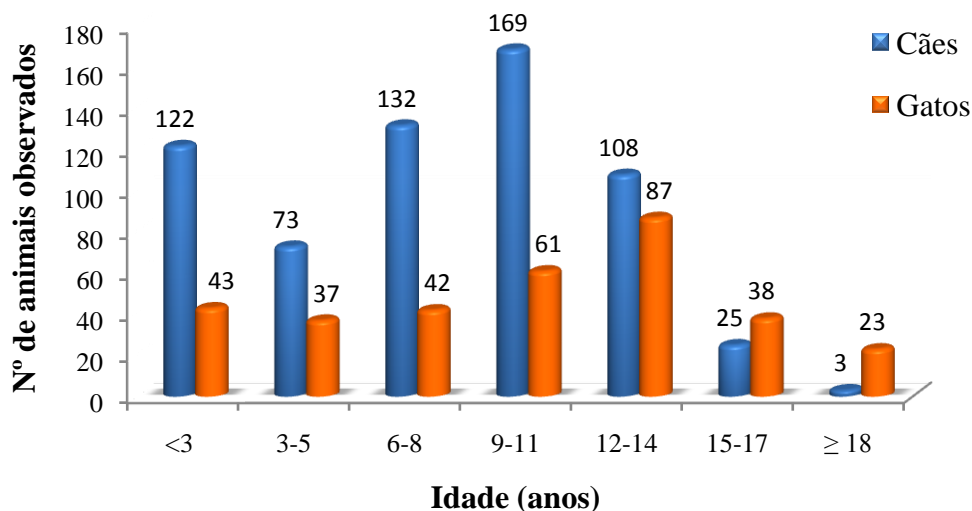
O IVP está vocacionado para animais de companhia, no entanto também dá assistência a animais exóticos como sendo o caso de leporídeos. Dos 966 animais apresentados às consultas os cães obtiveram maior frequência relativa (65,42%) seguido dos gatos (34,27%) e de animais exóticos (0,31%) (Gráfico 1).

**Gráfico 1. Distribuição dos animais de acordo com a espécie
(Frequência Absoluta, $f_i = 966$)**



Nos cães foram maioritariamente observados animais do género masculino (Frequência absoluta - $f_i = 338$; Frequência relativa - 53,48%) ao contrário do que sucedeu com os gatos que foram animais do género feminino que mais compareceram nas consultas (Frequência absoluta - $f_i = 170$; Frequência relativa - 51,36%), assim como os 3 leporídeos pertenciam todos ao género feminino.

Relativamente à distribuição das idades, no caso dos canídeos, houve uma maior prevalência de animais entre os 9 e os 11 anos. Em contrapartida nos felídeos esses valores variaram entre os 12 e os 14 anos (Gráfico 2). É de salientar que os felinos apresentam uma maior esperança de vida quando comparada com os cães.

Gráfico 2. Distribuição do nº de animais por idade e espécie

Durante o período de estágio, as 1070 consultas foram distribuídas por especialidade (54,11%), tratamentos/pós-operatório (28,60%) e medicina preventiva (17,29%). Como o IVP é um local de prestígio em diversas áreas clínicas, não é de surpreender que as consultas de especialidades tenham apresentado o maior número de animais observados.

Tabela 1. Distribuição das consultas por especialidade

	f_i	%		f_i	%
Cardiologia	127	21,97	Estomatologia	19	3,29
Gastrenterologia	100	17,30	Otorrinolaringologia	19	3,29
Oncologia	61	10,55	Neurologia	17	2,94
Dermatologia	47	8,13	Oftalmologia	14	2,42
Nefrologia/Urologia	42	7,27	Infeciologia	11	1,90
Ortopedia	33	5,71	Reprodução e Obstetrícia	11	1,90
Ginecologia/Andrologia	24	4,15	Parasitologia	6	1,04
Pneumologia	19	3,29	Comportamento	5	0,87
Endocrinologia	19	3,29	Outros	5	0,87

Na tabela 1, foram listadas as frequências relativas das consultas observadas por especialidade. As que apresentaram maior frequência relativa foram as de cardiologia (21,97%) seguida das consultas de gastroenterologia (17,30%) e de oncologia (10,55%). Os canídeos recorreram mais a consultas de cardiologia e gastroenterologia, enquanto que os

felídeos a consultas de nefrologia/urologia e dermatologia. Ambas as espécies apresentaram uma frequência semelhante em consultas de oncologia.

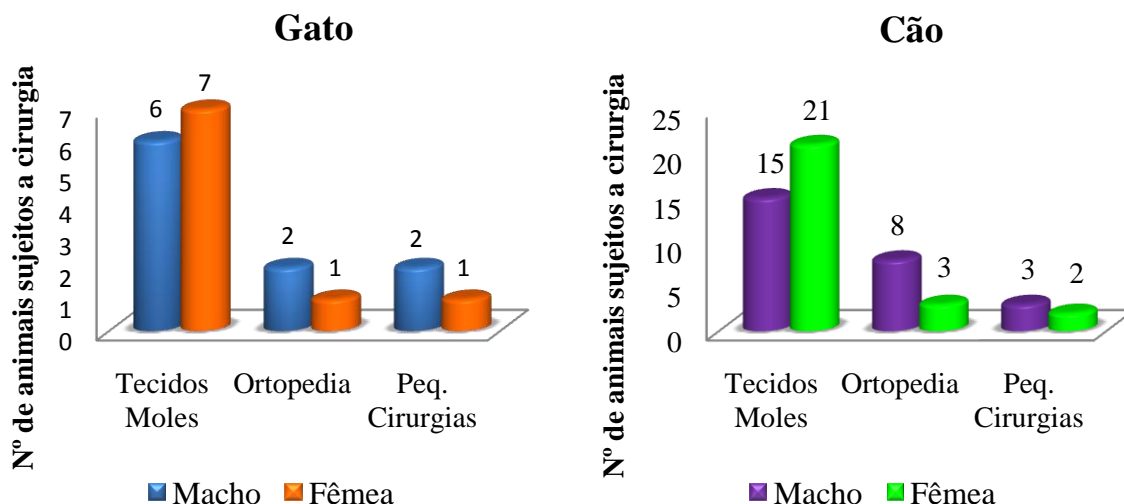
Nas consultas de tratamento/ pós-operatório estão incluídas a revisão de pacientes ou tratamento dos animais após intervenção cirúrgica (mudanças de pensos, remoção de suturas, desinfecção e limpeza das mesmas) e actos médicos simples (mas não menos importantes) como é o caso da fluidoterapia cutânea e o tratamento injectável.

As consultas de Medicina Preventiva englobaram vacinações, desparasitações (internas e externas), colocação de aparelhos de identificação electrónica e a realização de teste rápidos de diagnóstico. Foram sujeitos a vacinação 131 animais no total, sendo 99 caninos e 32 felinos. Do total de cães vacinados, 29 recorreram à vacina contra a Leishmaniose. Durante os 5 meses de estágio no IVP a autora acompanhou estes casos, tendo observado que apenas um destes animais fez reacção alérgica à vacina e que 24,14% (7 animais) dos outros pacientes apresentaram sinais de fadiga e prostração nas 24 horas seguintes à sua administração.

b. Área cirúrgica

A nível cirúrgico a autora teve a oportunidade de participar nas diferentes cirurgias como circulante, ajudante de cirurgião e anestesista, assim como na preparação do material cirúrgico. Cirurgicamente, acompanhou os pacientes, sempre sob supervisão, antes (preparando e administrando a pré-medicação e/ou anestesia, realizando a entubação endotraqueal, a tricotomia e a lavagem e desinfecção da zona da incisão), durante (como anestesista, monitorizando a anestesia com agentes voláteis ou como ajudante de cirurgião participando activamente nas cirurgias) e após a cirurgia ajudando no recobro.

As 71 cirurgias realizadas podem ser agrupadas em cirurgias de tecidos moles (69,01%), ortopedia (19,72%) e pequenas cirurgias (11,27%) (Gráfico 3). Relativamente às cirurgias de tecidos moles aquelas que foram praticadas com maior frequência foram a ovariectomia em fêmeas (gatas - 85,71% , cadelas - 57,89%) a nodulectomia cutânea em machos (gatos – 20 %, cães – 33,33%). A recessão da cabeça do fémur foi a cirurgia ortopédica com maior prevalência (felinos – 33,33%, caninos – 37,50%) e nas pequenas cirurgias a destartarização foi a que recebeu maior destaque em ambas as espécies.

Gráfico 3. Distribuição dos animais por tipo de cirurgia, espécie e género animal (fi = 71)**c. Exames complementares de diagnóstico**

Uma das principais actividades desenvolvidas no IVP é o recurso a exames complementares de diagnóstico. Estes são considerados uma mais-valia para a realização de diagnósticos definitivos bem como para a implementação de planos terapêuticos adequados a cada paciente. Por ser um local de prestígio são referenciados muitos casos com o intuito de realizar exames ecográficos. No total foram realizados 629 exames complementares de diagnóstico, obtendo maior predomínio as ecografias (63,28%), englobando, nomeadamente: torácicas, abdominais, oculares, testiculares, da tiróideias e cervicais (Tabela 2).

Tabela 2. Frequências absoluta e relativa dos exames complementares de diagnóstico observados

	<i>fi</i>	%		<i>fi</i>	%
Ecografia Abdominal/Pélvica	204	32,43	Urianálise	4	0,64
Ecografia Cardíaca/Torácica	149	23,69	Ecografia Ocular	3	0,48
Análises Bioquímicas	79	12,56	Ecografia da Tiróide	3	0,48
Electrocardiograma	67	10,65	Pesquisa de Hemoparasitas	2	0,32
Hematologia	57	9,06	Ecografia Tecidos moles	2	0,32
Ecografia Testicular	37	5,87	Análises Coprológicas	2	0,32
Radiografia	20	3,18			

d. Outras actividades desenvolvidas

No laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias e no laboratório de Virologia da FMV-UTL a autora realizou os testes de diagnóstico para pesquisa de infecção por *L. infantum* nas amostras de sangue recolhidas. Nomeadamente, através das técnicas de Imunofluorescência Indirecta (IFI) e da Reacção em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). Analisou-se também, para os resultados positivos (em ambas as técnicas citadas), a presença de vírus imunossupressores (FIV e FeLV).

A colheita das amostras de sangue (Figura 1), para a realização deste trabalho, foi efectuada durante e após a conclusão do estágio e teve o apoio de alguns colegas estagiários e de 6 instituições (o IVP, a Clínica VetLírios juntamente com a Associação Animais de Rua, o Hospital SOSAnimal Viseu, o Hospital Veterinário Tutti Natura de Viseu e a Associação Cantinhos dos Animais de Viseu).



Figura 1. Colheita das amostras de sangue.

Além deste estágio, no período compreendido entre 1 de Março a 31 de Maio de 2012 a autora realizou um estágio extracurricular no *Ottawa Veterinary Hospital* em Ottawa, Canadá. Durante estes 3 meses teve a oportunidade de participar em todas as áreas de clínica de animais de companhia onde adquiriu e praticou novas abordagens médicas e cirúrgicas e onde integrou uma equipa de veterinários, enfermeiros e auxiliares que a nível de profissionalismo, simpatia e carinho pelos seus pacientes excedeu as expectativas.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Leishmaniose

A partir do século IXX, Cunnigham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg, e Viannia, cada um, individualmente, identificou o parasita responsável pela Leishmaniose, o qual Ronald Ross designou de *Leishmania* (World Health Organisation, [WHO], 2010). Mas, foi em 1908 que Nicolle e Comte atribuíram o nome *Leishmania infantum* ao parasita, que descobriram o seu hospedeiro reservatório e que o cultivaram em laboratório pela primeira vez (WHO, 2010).

A Leishmaniose é uma doença causada por protozoários difásicos do género *Leishmania* que infectam diversos mamíferos, incluindo o Homem, e são transmitidos pela picada de vectores artrópodes do género *Phlebotomus* spp. no velho mundo e *Lutzomyia* spp. no novo mundo.

Nos humanos, a Leishmaniose apresenta um padrão clínico diverso e assim, baseado nos sintomas manifestados, a doença pode ser classificada em Leishmaniose Cutânea (LC), Mucocutânea (LMC) e Visceral (LV), também designada por “Kala-azar” (Gramiccia & Gradoni, 2005). Algumas espécies originam mais do que uma forma da doença, podendo, deste modo, haver múltiplas espécies responsáveis por cada tipo clínico de Leishmaniose. Clínica e epidemiologicamente existem duas formas de Leishmaniose visceral: Leishmaniose visceral zoonótica (LVZ), que afecta principalmente crianças e o cão (principal hospedeiro reservatório) e Leishmaniose antroponótica visceral (LAV) que afecta pessoas de todas as idades e é transmitida de humano para humano através da picada de insectos flebotomíneos (Quinnell & Courtenay, 2009). Na Europa, *Leishmania infantum* é o agente da Leishmaniose cutânea e visceral (Tomás & Romão, 2008; Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau & Ferrer, 2008).

A LVZ é uma doença que está associada maioritariamente aos canídeos por constituir o principal hospedeiro reservatório (Oliveira, Diaz, Santos, Bourdeau & Pereira da Fonseca, 2010; Campino & Maia, 2010; Baneth *et al.*, 2008), no entanto, devido ao avanço de estudos científicos surgiu um novo paradigma que tem como principal consideração a possibilidade do gato (*Felis catus*) também estar implicada no processo de distribuição da doença.

1.1 Agente Etiológico: *Leishmania* spp.

Taxonomicamente *Leishmania* spp. pertence ao Filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae (Greene, 2006). O género *Leishmania* dá origem aos subgéneros *Leishmania* e *Viannia* que diferem no desenvolvimento

no vector (Greene, 2006). Ao primeiro pertencem as espécies: *L.tropica*, *L.major* e *L.aethiopica*, o complexo *L.donovani* (*L.infantum*, *L.donovani* e *L.chagasi*) e o complexo *L.mexicana* (*L.mexicana*, *L.amazonensis* e *L.venezuelensis*). O subgénero *Viannia* é representado por 4 espécies principais: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana* (Hubálek & Rudolf, 2011) (Tabela 3). Na presente dissertação apenas daremos ênfase ao subgénero *Leishmania*.

É de referir que no complexo *L.donovani*, a espécie *L.donovani donovani* está associada ao desenvolvimento da doença nos humanos e a espécie *L.donovani infantum* (syn. *L.donovani chagasi* na América) associada aos animais (Quinnell & Courtenay, 2009).

Tabela 3. Espécies do género *Leishmania* e os seus respectivos hospedeiros reservatórios, distribuição geográfica e vectores (adaptado de Greene, 2006).

Espécies	Hospedeiro Reservatório	Distribuição Geográfica	Vector
LEISHMANIOSE VISCERAL			
<i>L.donovani infantum</i>	Cão, Homem, Raposa, Gato	Bacia Mediterrânea, Centro e Sul da América, Ásia central	<i>Phlebotomus</i> spp.
<i>L.donovani donovani</i>	Cão, Raposa, Homem	África, Ásia, Países de Leste, Sul da Rússia	<i>Phlebotomus</i> spp.
<i>L.donovani chagasi</i> *	Cão, Homem, Raposa, Gato	Centro e Sul da América	<i>Lutzomyia</i> spp.
LEISHMANIOSE CUTÂNEA			
<i>L.tropica</i>	Roedores, Cão, Homem	Sul da Europa, Países de Leste, África	<i>Phlebotomus</i> spp.
<i>L.major</i>	Roedores	África do norte, Países de Leste, Ásia central	<i>Phlebotomus</i> spp.
<i>L.aethiopica</i>	<i>Hyrax</i> sp., Homem	Etiópia, Quênia	<i>Phlebotomus</i> spp.
<i>L. (V.) braziliensis</i>	Roedores, Homem	México, Brasil	<i>Lutzomyia</i> spp., <i>Psychodopyus</i> spp.
<i>L.mexicana</i>	Roedores, Homem	América central	<i>Lutzomyia</i> spp.

*Alguns autores consideram esta espécie sinónima de *L.donovani infantum* (Mauricio *et al.*, 2000, citado por Quinnell & Courtenay, 2009)

Leishmania é um protozoário dimórfico caracterizado pela presença intracelular de um cinetoplasto, que corresponde a uma área mitocondrial que possui material genético, situado na base do flagelo. Este último confere motilidade à forma promastigota e na forma

amastigota, embora seja rudimentar, desempenha um papel na organização e/ou percepção sensorial do parasita (Gluezn *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011).

No seu ciclo biológico este protozoário apresenta-se sob dois tipos de morfologia, consoante o hospedeiro:

- promastigota (no hospedeiro invertebrado): forma fusiforme com cerca de $14-25 \times 1,5-3 \mu\text{m}$, extracelular, com um flagelo na porção anterior (Figura 2);
- amastigota (no hospedeiro vertebrado): forma arredondada ou oval, com cerca de $2,5-5 \times 1,5-2 \mu\text{m}$, intracelular, com um flagelo rudimentar (Figura 2 e 3).

Figura 2. Representação ilustrativa das formas promastigota (A) e amastigota (B)
(Adaptado de Besteiro *et al.*, 2007)

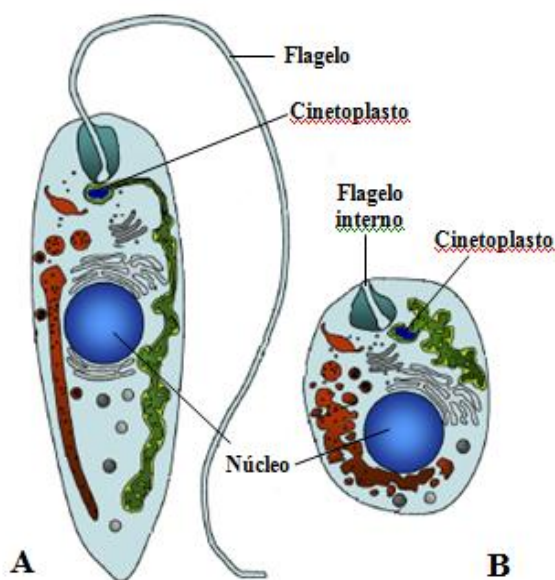
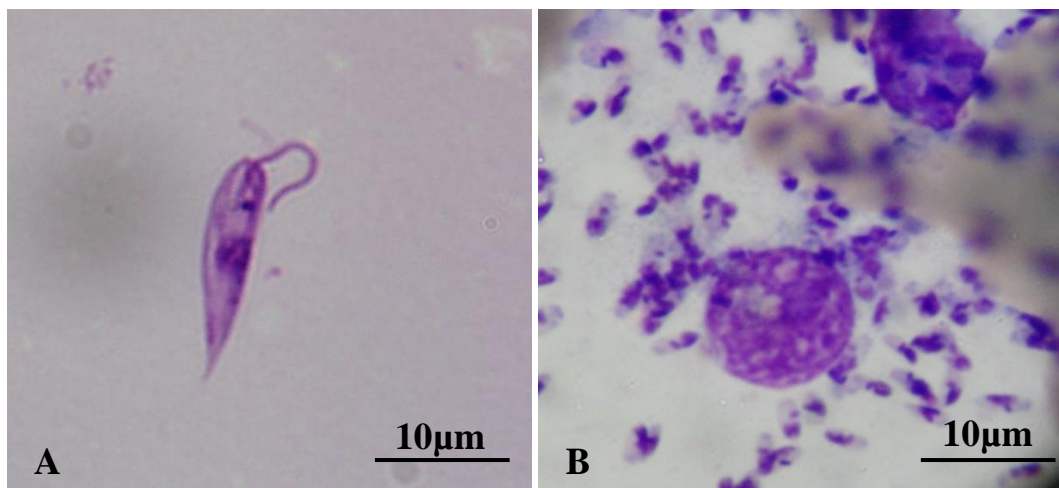


Figura 3. Aspecto da forma promastigota (A) e de formas amastigotas (B) no interior de macrófagos de cão.



Actualmente, existem vários métodos para a diferenciação e classificação das espécies de *Leishmania* utilizando métodos bioquímicos e genéticos, como a análise estrutural da membrana celular e dos ácidos gordos, a reactividade imunológica a anticorpos monoclonais, a sequenciação de ADN e a avaliação de isoenzimas (Campino *et al.*, 2006; Cortes *et al.*, 2006).

No início dos anos 80, a identificação isoenzimática, através da técnica de eletroforese enzimática multilocular, começou a ser reconhecida e é ainda hoje, considerada a técnica “gold standard” para classificar e identificar a diversidade das espécies do género *Leishmania* (Campino *et al.*, 2006, Cortes *et al.*, 2006; Kuhls *et al.*, 2008). No entanto, as limitações desta técnica - requerer um isolado do parasita em cultura e a utilização desta técnica apenas em alguns centros – proporcionam o avanço de outros métodos como PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) que podem ser efectuados directamente a partir das amostras dos hospedeiros e vectores, sem ser necessário a cultura do parasita (Cortes *et al.*, 2006; WHO, 2010). Deste modo, a identificação depende do método utilizado:

- zimodemes: parasitas que têm em comum um padrão isoenzimático identificado por eletroforese (WHO, 2010);

- esquizodemes: parasitas que partilham “padrões de impressões digitais” obtidos pela digestão do kADN (ADN do cinetoplasto) por restrição enzimática (WHO, 2010).

L. infantum foi subdividida em zimodemes MON (classificação baseada em 15 sistemas enzimáticos) pelo laboratório de referência em Montpellier para a Organização Mundial de Saúde (Hide, Bañuls & Tibayrenc, 2001).

Em Portugal, num estudo realizado por Campino *et al.* (2006) em pessoas imunocomprometidas, cães, raposas e flebótomos foram identificados 4 zimodemes: MON-1, MON-24, MON-29 e MON-80. Cardoso *et al.* (2002) identificaram *L. infantum* MON-98 num cão na zona do Alto Douro. Igualmente como na Europa o zimodeme MON-1 é o mais comum encontrado em Portugal (Cortes *et al.*, 2006; Baptista-Fernandes *et al.*, 2007 citado por Oliveira *et al.*, 2010).

Na Europa, desde 1980, foram reportados vários casos de infecção por *L. infantum* em gatos, a maioria pertencentes ao zimodeme MON-1 (Ozon *et al.*, 1998; Grevot *et al.*, 2005; Campino *et al.*, 2006; Pennisi, 2010 citado por Gramiccia, 2011).

1.2 Hospedeiros Invertebrados

Os flebotomíneos, taxonomicamente pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae. Dentro desta família são reconhecidos 6 géneros dos quais três têm importância em medicina humana e veterinária: os géneros *Phlebotomus* (subdividido em 12 subgéneros) e *Sergentomyia* no Velho Mundo, e *Lutzomyia* no Novo mundo, subdividido em 25 subgéneros (Killick-Kendrick, 1999). Todos os vectores de *Leishmania* são espécies desta família.

Os flebótomos são dípteros de pequenas dimensões cujo comprimento do corpo não excede os 3mm, têm uma coloração amarela clara e uma densa pilosidade que cobre todo o corpo, incluído patas e asas. As suas patas são longas e a armadura bucal picadora é tão longa quanto a cabeça (Killick-Kendrick, 1999; Corrales & Moreno, 2006). Em repouso, as asas formam um angulo de 45° com o abdómen. São dotados de características comportamentais próprias como: o atacar silenciosamente, o rondar o hospedeiro antes de se fixarem para se alimentar e o facto de não possuírem grandes habilidades de voo pelo que se encontram normalmente junto dos locais onde se alimentam (Killick-Kendrick, 1999; Rosypal, Zajac & Lindsay, 2003; Corrales & Moreno, 2006). A actividade dos flebótomos é crepuscular ou nocturna, embora haja algumas espécies que se alimentem à luz do dia. Tanto as fêmeas como os machos alimentam-se de fontes naturais de açúcar (Afonso & Alves-Pires, 2008), porém apenas as fêmeas se alimentam de sangue o que lhes proporciona uma nutrição adequada para a produção e maturação dos seus ovos (Rosypal *et al.*, 2003). Estas são predominantemente exofágicas (alimentam-se no exterior) e exofílicas. Contudo, há também espécies que são endofílicas (Killick-Kendrick, 1999). O aparelho bucal das fêmeas é do tipo sugador e possui ductos salivares responsáveis pela síntese de saliva rica em biomoléculas activas, com capacidade de facilitar a implantação da *Leishmania* spp. nos animais reservatórios (Alves-Pires, 2000; Rosypal *et al.*, 2003). Deste modo, a fêmea ao efectuar uma refeição sanguínea, faz inicialmente um micro-hematoma no hospedeiro vertebrado, do qual o sangue é sugado e ingerido (telmofagia), contrariamente ao que se sucede com os mosquitos, cujo as fêmeas sugam o sangue directamente dos capilares sanguíneos do hospedeiro vertebrado (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Os biótopos onde se encontram estes insectos possuem temperaturas moderadas e estáveis, escassa ou nula iluminação, humidade relativa elevada e um alto teor em matéria orgânica de origem animal ou vegetal que lhes serve de alimento (Corrales & Moreno, 2006). O clima exerce uma influência decisiva sobre a fenologia dos flebotomíneos que varia de acordo com a região geográfica, assim sendo, no nosso país a actividade destes vectores biológicos

estende-se, em média de Maio até Outubro (Alves-Pires, 2000). Com as alterações climáticas que se têm vindo a registar assim como a introdução da “mão humana” nos habitats destes vectores, o seu período de actividade, actualmente, prolonga-se de Março a Outubro.

Os flebótomos são insectos holometabólicos, ou seja, apresentam metamorfoses completas, sendo o seu ciclo biológico dividido entre o meio aéreo, onde estão presentes os adultos e o meio terrestre, onde se desenvolvem, de forma livre, os ovos, os quatro estádios larvares e as pupas. A duração do ciclo de vida é variável, em função da temperatura, humidade e fotoperíodo (Rosypal *et al.*, 2003; Afonso & Alves-Pires, 2008).

Actualmente, são conhecidas em Portugal cinco espécies de flebótomos, sendo quatro do género *Phlebotomus* (*P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. papatasi* e *P. sergenti*) e uma do género *Sergentomya* (*Sergentomya minuta*). Esta última espécie não é antropofílica, mas sim zoofílica, com especial preferência por animais poiquilotérmicos (Alves-Pires, 2000).

P. perniciosus (Figura 4) manifesta claramente um carácter endofílico, encontrando-se sobretudo em biótopos domésticos, enquanto *P. ariasi* apresenta um comportamento exofílico dominando os biótopos silváticos. Este comportamento tão diferenciado das duas espécies vectoras de *Leishmania* fundamenta o facto de *P. perniciosus* ser o principal responsável pela transmissão no ciclo doméstico e *P. ariasi* o principal responsável pela transmissão no ciclo silvático.

Estas duas espécies possuem tipos de evolução sazonal distintos. Neste contexto, *P. ariasi* possui um ciclo difásico com 2 picos de eclosões: Junho e Setembro, enquanto que *P. perniciosus* possui um ciclo monofásico com apenas um pico de eclosão em Julho (Alves-Pires, 2000).



Figura 4. *Phlebotomus perniciosus* macho
(González, 2006)

1.3 Hospedeiros Vertebrados

Vários mamíferos são considerados hospedeiros reservatórios de *Leishmania* spp. incluindo animais selvagens, domésticos e o próprio ser humano. Dos animais domésticos, o cão (*Canis lupus familiaris*) é considerado universalmente o hospedeiro reservatório principal no ciclo zoonótico da LV (Quinnel & Courtenay, 2009; Maia & Campino, 2011). Com a urbanização das Leishmanioses juntamente com o facto da Leishmaniose canina poder ser controlada significativamente com colares de deltametrina nos cães, outros animais podem ser infectados, tornarem-se doentes e até serem incluídos na distribuição da doença numa zona endémica (Simões-Matos, Bevilaqua, Mattos & Pompeu, 2004).

A infecção já foi descrita em vários animais domésticos e selvagens como carnívoros (canídeos, felídeos, mustelídeos, viverrídeos, ursídeos), didelfimorfos (opossums), roedores (murídeos, histicídeos, cricetídeos), equídeos e primatas (Ashford 1996, citado por Quinnel & Courtenay, 2009).

Até 2003 tinham sido descritos cinco casos de Leishmaniose equina na Europa, todos eles causados por *L. infantum* (Rolão, Martins, João & Campino, 2005). Com o aumento de casos reportados de Leishmaniose em equinos domésticos especulou-se sobre o verdadeiro papel que estes animais desempenhavam na epidemiologia das Leishmanioses zoonóticas. Contudo, estes parecem ter uma resposta clínica e imunológica resistente à infecção, pelo que se concluiu que se tratam apenas de hospedeiros acidentais (Gramiccia & Gradoni, 2005). O mesmo concluíram Otranto *et al.*, (2010) após realizarem estudos em galinhas, e Lobsiger *et al.*, (2010) em bovinos na Suíça.

Desde que em 1912 o primeiro caso de Leishmaniose felina (Lfel) foi reportado por Sergent, alguns autores têm posto em causa se o gato doméstico (*Felis catus domesticus*) poderá estar implicado na distribuição da doença. Mesmo aqueles que defendem que esta espécie é importante para a manutenção do ciclo biológico do parasita, a categorização destes animais como hospedeiro primário ou secundário continua inconclusiva (Maia & Campino, 2011). Mais recentemente, a infecção do gato doméstico por *L. infantum* tem vindo a ser reportado em vários países da Europa, Médio Oriente e Brasil (Maia & Campino, 2011). Simões-Matos *et al.* (2004) defendem que a espécie *Felis catus* pode ser realmente infectada por *Leishmania* spp., que se podem tornar ou não clinicamente doentes e que são atraídos por alguns *Phlebotomus* spp. como fonte sanguínea.

2. Ciclo Biológico

2.1 Desenvolvimento no Hospedeiro Invertebrado

O parasita no hospedeiro invertebrado adquire várias formas intermédias durante o seu desenvolvimento passando em cada fase por alterações morfológicas e funcionais que visam garantir a sobrevivência no vector (Kamhawi, 2006).

O ciclo biológico no insecto completa-se em 6 a 9 dias dependendo da espécie (Kamhawi, 2006). Inicia-se com a refeição no hospedeiro mamífero pelo flebótomo fêmea onde são ingeridas as formas amastigotas. Durante as primeiras 24 horas diferenciam-se em promastigotas procíclicos (formas alongadas e grossas) no bolbo sanguíneo (Alves-Pires, 2000; Afonso & Alves-Pires, 2008) o que constitui a primeira fase de multiplicação intravectorial. Nas 24 a 48 horas posteriores, transformam-se em formas mais alongadas designadas por nectomonas (Alves-Pires, 2000). Entre o 3º e o 5º dia, as nectomonas fixam-se pelo flagelo, ao intestino médio o que impede a sua eliminação pelo intestino posterior (Alves-Pires, 2000). As leptomonas emergem das nectomonas e migram até à região torácica do intestino médio, o que constitui a segunda fase de multiplicação (Kamhawi, 2006). Na válvula estemodeal são observadas duas formas: promastigotas haptomonas e metacíclicas, esta última representando a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. As haptomonas ao se fixarem à válvula estemodeal provocam a degenerescência da mesma, permitindo às formas metacíclicas atingirem a cavidade oral e penetrarem no hospedeiro vertebrado aquando de uma nova refeição (Volf *et al.*, 2004 citado por Tomás & Romão, 2008). A perda da funcionalidade da válvula, juntamente com a oclusão do lúmen intestinal causada pelos parasitas e por uma matriz de fosfoglicanos secretada pelos leptomonas, impedem o insecto de realizar refeições completas. Este facto obriga o vector a picar vários hospedeiros, na tentativa de obter a quantidade de sangue de que necessita (Rogers, Chance & Bates, 2002; Rosypal, Zajac & Lindsay, 2003). Isso parece explicar que num determinado foco, se verifique uma elevada prevalência de Leishmaniose apesar de uma baixa taxa de infecção flebotomínica (Afonso & Alves-Pires, 2008) (Figura 5).

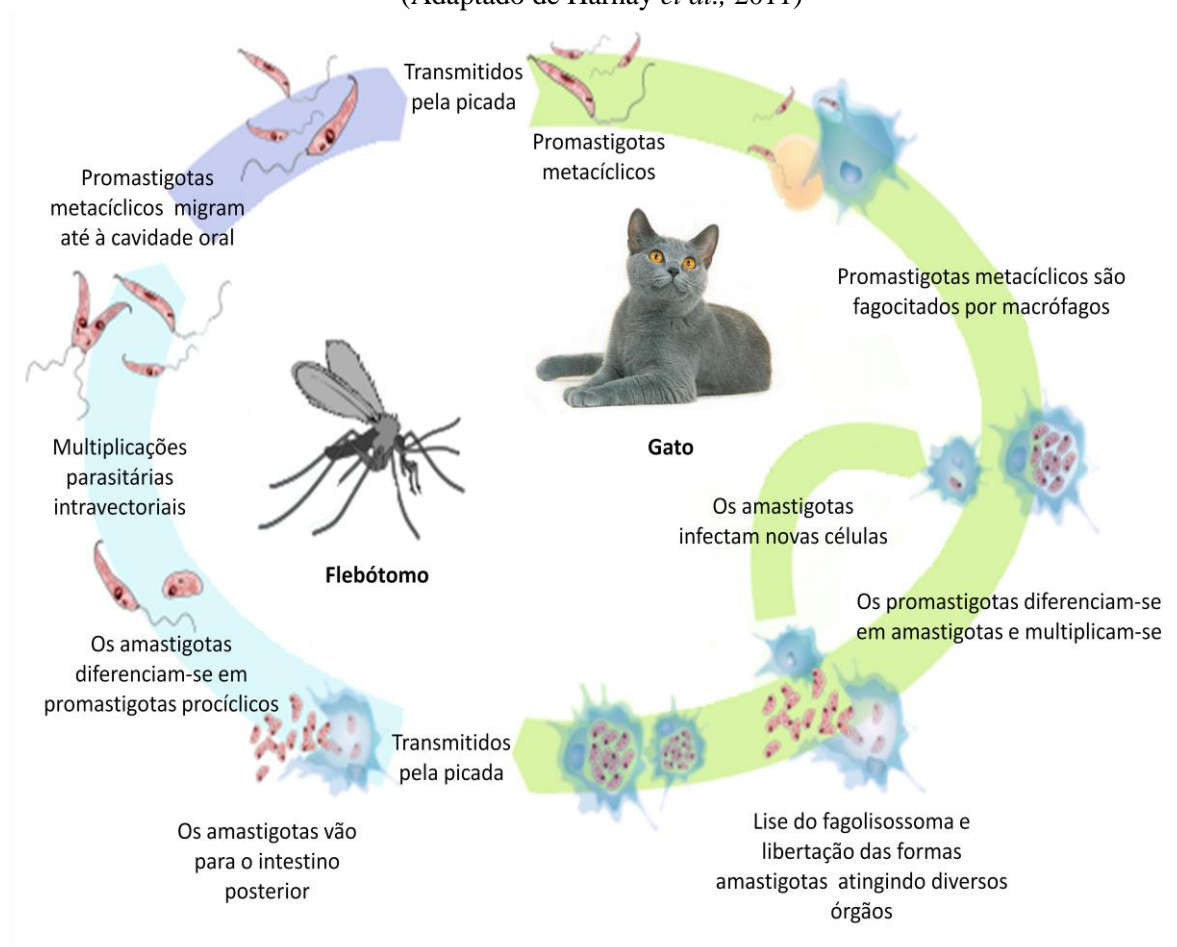
2.2 Desenvolvimento no Hospedeiro Vertebrado

As principais zonas atingidas pela picada do flebotomíneo são zonas glabras, ou seja, desprovidas de pêlo como as orelhas, o focinho e o abdómen.

No hospedeiro mamífero o desenvolvimento biológico de *Leishmania* é relativamente simples e consistente nas diferentes espécies: promastigotas metacíclicos (forma infectante) são

introduzidas, através da picada dos flebótomos (Killick-Kendrick (1999) citado por Gossage Rogers & Bates, 2003) e ao serem interiorizadas por macrófagos e pelas células dendríticas da pele transformam-se na forma intracelular: amastigota. Após a fusão dos fagossomas contendo o parasita com lisossomas formam-se os vacúolos parasitóforos (Carvalho *et al.*, 2008). Estes apresentam um ambiente fortemente hidrolítico e ácido, contudo o parasita não é atenuado neste ambiente hostil (Burchmore & Barrett, 2001). Em vez disso, beneficia do baixo peso molecular dos nutrientes que são gerados pelos processos digestivos no vacúolo. Enquanto o citoplasma do parasita é mantido activamente a um pH neutro, a membrana da superfície do amastigotas está adaptada para funcionar de forma óptima num ambiente ácido e a temperaturas extremamente elevadas (Burchmore & Barrett, 2001). Em seguida ocorre a lise das células infectadas e os amastigotas invadem novas células (Figura 5).

Figura 5. Resumo ilustrativo do ciclo de vida de *Leishmania infantum*
(Adaptado de Harhay *et al.*, 2011)



As formas amastigotas estão, geralmente, localizadas nas células do Sistema Macrofágico Fagocítico (SMF), nomeadamente nos macrófagos, monócitos, células de Langerhans, células de Kupffer e células apresentadoras de antígenos (Baneth *et al.*, 2008). Deste modo, o protozoário não fica confinado na pele, sendo transportado, através do sangue e linfa, o que resulta na sua disseminação por todo o organismo do hospedeiro, mas, principalmente, até aos órgãos do sistema hemolinfático como o fígado, o baço, a medula óssea e os linfonodos. Sabe-se ainda que podem infectar também células não fagocitárias, embora os mecanismos de entrada nestas células ainda não sejam totalmente conhecidos (Kima, 2007).

3. Vias de transmissão/ Vias de infecção

Embora seja aceite que a transmissão natural de *Leishmania* ocorra pela picada de um flebótomo fêmea, outras vias de transmissão foram já documentadas. Neste contexto, Coutinho *et al.* (2005) descreveram um caso de transmissão oral de *L. chagasi* (syn, *L. infantum*) por um ixodídeo (*Rhipicephalus sanguineus*) no Brasil. Do mesmo modo, Ferreira, Fattori, Souza & Lima (2009), realizaram um estudo que confirmou que as pulgas (*Ctenocephalides felis*) podem funcionar como vector de *Leishmania* spp. Estudos recentes permitiram constatar que a infecção por estes ectoparasitas ocorre após a ingestão de sangue de cães infectados com o protozoário, tendo sido possível verificar que a inoculação, por via oral ou intraperitoneal, conduz à infecção em roedores. Contudo, apesar de estes resultados sugerirem que a ingestão destes ectoparasitas infectados pode ser uma via alternativa de transmissão de *Leishmania* para os canídeos, ainda não foi comprovada a sua competência vectorial e o seu verdadeiro papel na epidemiologia da doença (Coutinho & Linardi, 2007; Freitas, Melo, Costa-Val & Michalick, 2006).

A transmissão vertical de *L. infantum* já foi demonstrada experimentalmente em cães de raça Beagle, ratos, e em cães naturalmente infectados nas zonas endémicas da doença (Silva *et al.*, 2009; Rosypal *et al.*, 2003; Mancianti & Sozzi, 1995 citado por Boggiato *et al.*, 2011).

Evidências indicam também que a *Leishmania* pode ser experimentalmente transmitida por sangue total ou fracções de células mononucleares de cães infectados a animais receptores, independentemente da condição clínica do dador (Freitas *et al.*, 2006). Estes animais após a inoculação com sangue infectado desenvolveram a doença e apresentavam hepatomegália, esplenomegália, linfadenomegália e em alguns casos líquido ascítico (Freitas *et al.*, 2006). Silva *et al.* (2009) reportaram o primeiro caso de infecção por *L. chagasi* por via sexual em cães na ausência do vector biológico. Este estudo revelou uma elevada prevalência de *Leishmania* presente no sêmen dos cães e demonstrou a presença do parasita no aparelho

genital dos machos em especial pênis, prepúcio, glande e epidídimo resultando na inflamação destes órgãos. Contrariamente, nas fêmeas com Lcan o aparelho genital feminino não apresenta lesões específicas.

Até ao momento, não foram documentados estudos sobre formas de transmissão independentes do vector flebotomíneo em gatos. No entanto, todos os animais em regiões endémicas devem ser testados para *Leishmania* antes de serem seleccionados como reprodutores ou como dadores de sangue.

4. Susceptibilidade à infecção/ Factores de Risco

Com o aumento de casos reportados de Lfel na Europa aumenta também a suspeita do gato (*Felis catus domesticus*) ser um potencial hospedeiro reservatório no ciclo doméstico de *L. infantum*. Maia e Campino (2011) enunciaram as características que permitem incluir o gato no ciclo biológico do parasita:

1- são naturalmente suscetíveis à infecção por *L.infantum*, normalmente com a ausência de sinais clínicos (estes quando presentes são geralmente cutâneos, mas há casos de dispersão visceral),

2- são considerados uma fonte de alimentação sanguínea para os vectores biológicos (*Phebotomus spp e Lutzomyia spp*);

3- contêm um número suficiente de parasitas que pode ser transmitido e infectar os vectores;

4- e é, juntamente com o cão, um dos animais domésticos mais comuns que está presente em áreas endémicas da doença. Apesar disto, é ainda controversa a categorização destes animais como hospedeiro primário ou secundário (Maia & Campino, 2011).

Por outro lado, doenças imunossupressoras como FIV (Vírus da imunodeficiência felina), FeLV (Vírus da leucemia felina), PIF (Vírus da Peritonite infecciosa felina), doenças autoimunes (*e.g.* pênfigos) e tumores (*e.g.* carcinoma espinocelular) podem funcionar a favor do parasita proporcionando a sua multiplicação (Martin-Sanchez *et al.*, 2007; Maia & Campino, 2011). Maia *et al.* (2010), após estudos efectuados em regiões endémicas da doença em Portugal, verificaram que a percentagem de anticorpos detectada para FIV, FeLV e PIF era de 29,4%, 37,5% e 26,7% respectivamente, comprovando assim a falta de associação entre a presença de *Leishmania* e a infecção por estes vírus. Também na maior parte dos rastreios epidemiológicos a associação entre a positividade em relação a FIV, FeLV e/ou parasitoses concomitantes (*e.g.* infecção por *Toxoplasma gondii*) e a presença de anticorpos

anti-*Leishmania* ou de ADN do parasita não foi observada (Mancianti, 2004; Solano-Gallego *et al.*, 2007; Martin-Sanchez *et al.*, 2007; Sobrinho *et al.*, 2010; Maia & Campino, 2011).

Num estudo realizado por Pennisi (2002), a autora confirmou a predisposição para o sexo feminino e para gatos com uma idade superior a dois anos. Relativamente à predisposição racial, Navarro *et al.* (2010), observaram que a raça Europeu comum era a mais afectada. Já Cardoso, Lopes, Sherry & Schallig (2010), observaram uma maior seroprevalência em animais de ambientes rurais, defendendo que estes são mais susceptíveis pois permanecem a maior parte do tempo no exterior e sem profilaxia insecticida.

5. Epidemiologia

A Leishmaniose provocada pelo protozoário *Leishmania* spp. é endémica em 88 países nos 4 continentes (WHO, 2010) e em termos globais é a terceira doença mais importante transmitida por vectores biológicos sendo considerada um grave problema em Medicina Veterinária e em Saúde Pública nos países da Bacia Mediterrânea, Médio Oriente e da América do Sul. A emergência e/ou reemergência desta parasitose, ocorrida nos últimos anos deve-se a uma multiplicidade de factores, nomeadamente as alterações climáticas, as modificações das condições sócio-económicas e a resistência dos parasitas e dos vectores aos fármacos e insecticidas em uso (Campino & Maia, 2010). As alterações do ambiente que se têm vindo a registar têm tido uma forte influência sobre a epidemiologia, e tem sido sugerido que a distribuição e carga da doença sejam afectados pela mudança climática causada pelo aquecimento global (WHO, 2010).

Leishmania infantum é o agente etiológico da Leishmaniose canina (Lcan), humana (Lhum) e felina (Lfel) e encontra-se mundialmente distribuído.

Em Portugal, desde 2000 até 2009 foram diagnosticados laboratorialmente, 173 novos casos de LVZ, 66 em indivíduos imunocompetentes (46 crianças e 20 adultos) e os outros 107 em adultos imunodeprimidos (Campino & Maia, 2010). Por outro lado, a propagação da infecção pelo HIV (Vírus de Imunodeficiência Humana) é um dos factores que tem tornado as pessoas mais susceptíveis à LVZ, estimando-se que sejam diagnosticados por ano, no nosso país, 15 a 20 novos casos de em indivíduos imunocomprometidos (OnLeish, 2010).

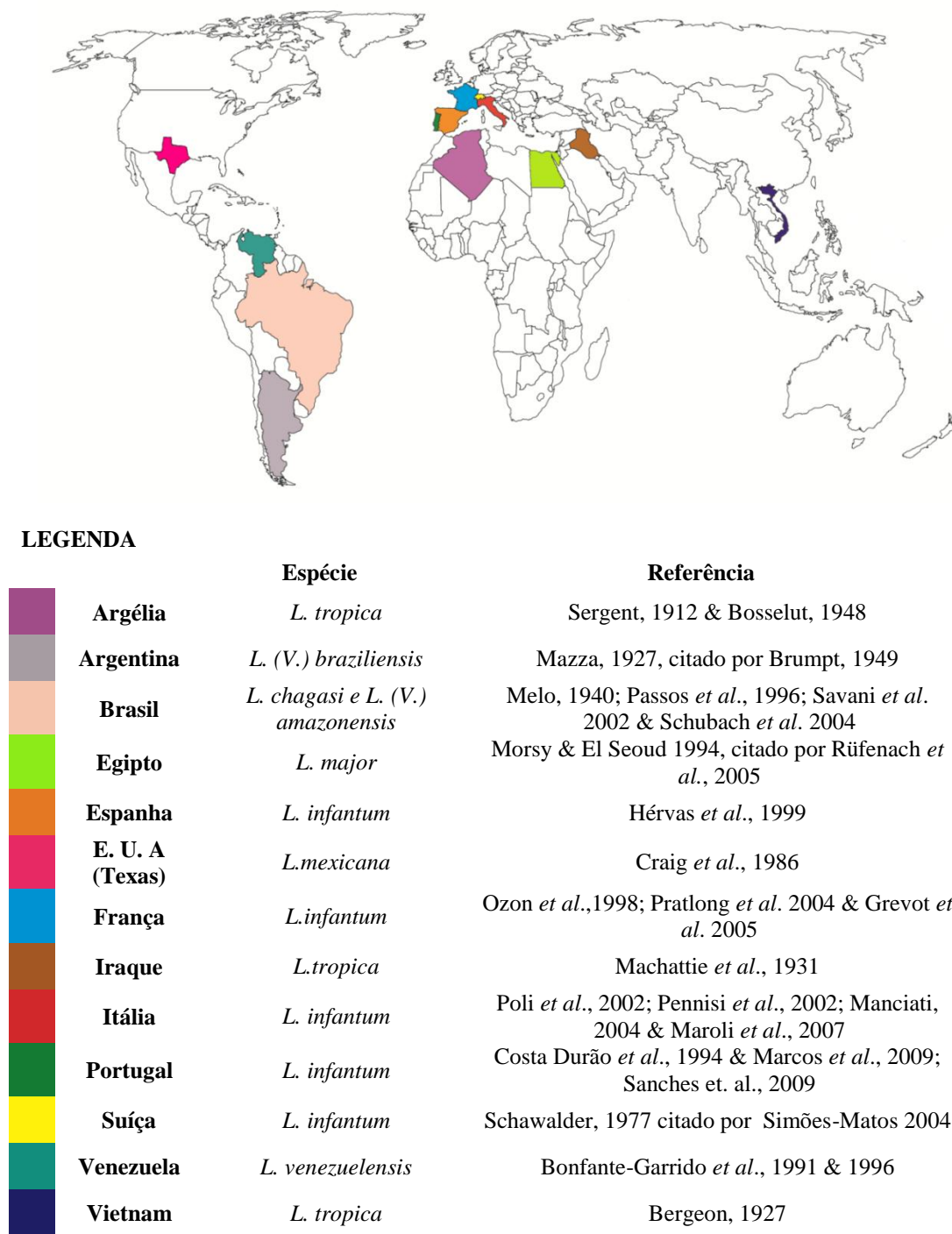
Nos últimos anos, os valores de seroprevalência em cães de Portugal, Espanha, Itália e França demonstraram que cerca de 2,5 milhões de animais se encontravam infectados. No nosso país o número de casos de Lcan tem vindo a aumentar estando esta zoonose incluída, desde 2002, no grupo de doenças de notificação obrigatória (Campino & Maia, 2010). A infecção por *L. infantum* está presente por todo o território continental tanto em áreas rurais como urbanas.

Inicialmente identificaram-se 4 focos endémicos: região do Alto Douro, região Metropolitana de Lisboa, a região de Évora e a região do Algarve (Cortes *et al.*, 2006; Afonso e Alves-Pires, 2008). Mais recentemente, têm sido assinaladas outras áreas em que os níveis de infecção são condizentes com o carácter endémico da doença. São elas o concelho de Évora, Lousã, Alcanena, Santarém, Coimbra, Arganil, Proença-a-Nova, Sertã, a sub região da Cova da Beira e Trás-os-Montes e Alto Douro e o concelho de Mação (Oliveira *et al.*, 2010; Campino *et al.*, 2010).

No Norte, Trás-os-Montes e Alto Douro possuem elevados níveis de endemicidade de Lcan e seroprevalências locais apontam para valores entre os 6,5% e os 20% (Cardoso *et al.*, 2010).

Mais recentemente, Cortes *et al.* (2012), num estudo realizado em 3974 cães, registaram nos distritos de Beja, Castelo Branco e Portalegre a maior seroprevalência de Lcan. É importante salientar que nos últimos anos (2004-2008), do total de 79 casos de leishmaniose humana notificados, sete casos eram de Beja (Alentejo) e seis de Portalegre (Alentejo), o que está de acordo com a ocorrência de um maior número de casos de Lcan nesses distritos. Neste estudo os autores constataram que a prevalência era 2,43vezes maior nos distritos das regiões do interior de Portugal, em comparação com as da zona litoral.

A infecção natural de um gato doméstico teve sua primeira descrição em 1912, na Argélia, num animal de quatro meses de idade, que convivia com um cão e uma criança, portadores de Leishmaniose visceral. O diagnóstico baseou-se no achado de formas amastigotas do parasita na medula óssea (Costa *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2008; Martín-Sánchez *et al.*, 2007) e desde então o número de casos documentados tem vindo a aumentar, especialmente em zonas em que a doença é considerada endémica (Figura 6).

Figura 6. Casos de Lfel reportados a nível mundial.

Na Europa têm sido efectuados estudos epidemiológicos que obtiveram prevalências de Lfel que variam entre os 1,7% e os 68% (Maroli *et al.*, 2007). Mais particularmente, no Sul, têm sido descritos rastreios epidemiológicos que mostram as diversas prevalências consoante o tipo de técnica utilizado (PCR, IF, TAD, ELISA) e local geográfico (Tabela 4).

Tabela 4. Seroprevalências de estudos sobre a infecção por *Leishmania infantum* em gatos no Sul da Europa entre 2002 e 2010.

País/ Referência	Nº total de gatos examinados	Seroprevalência (%)	Técnica de Diagnóstico
ITÁLIA			
Poli <i>et al.</i> , 2002	110	0,9	IFI
Pennisi <i>et al.</i> , 2004	93	59	IFI
Vita <i>et al.</i> , 2005	203	16,3	IFI
GRÉCIA			
Huebner <i>et al.</i> , 2008	389	21,6	IFI
Diakou <i>et al.</i> , 2009	284	3,87	ELISA-IgG
ESPANHA			
Zárate-Ramos <i>et al.</i> , 2002	50	42	TAD
Martin-Sanchez <i>et al.</i> , 2007	183	25,7	PCR
		28,3	IFI
Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2007	445	6,29	ELISA- Prot A
		5,25	ELISA- IgG
Ayllon <i>et al.</i> , 2008	233	0,43	PCR
		1,29	IFI
Tabar, <i>et al.</i> , 2008	100	3	PCR
Sherry <i>et al.</i> , 2011	105	8,7	PCR
		13,2	ELISA-IgG
PORTUGAL			
Vaz <i>et al.</i> , 2005	97	1,03	IFI
Maia <i>et al.</i> , 2008	23	30,4	PCR
Duarte <i>et al.</i> , 2010	180	0,6	IFI
Cardoso <i>et al.</i> , 2010	316	1,9	TAD
		2,84	ELISA-IgG
Maia <i>et al.</i> , 2010	142	20,3	IFI
		1,32	PCR

IFI: Imunofluorescência Indirecta; PCR: Polimerase Chain Reaction; TAD: Teste de Aglutinação Directa; ELISA: Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay; Prot A: Proteína A; IgG: Imunoglobulina G

Deste modo, em Itália as percentagens de infecção felina por *Leishmania* spp. variam entre 0,9%-59%, em Espanha entre 0,43%-42%, em Portugal 0,6%-30,4% e na Grécia entre 3,84% a 21,6%.

Alguns países do Médio Oriente também procederam a estudos de seroprevalência da infecção por *L. infantum* como Jerusalém onde se verificaram valores na ordem dos 6,7% numa amostra de 104 gatos. Isto pode ser associado, em parte, com um aumento da incidência da infecção por *Leishmania*, com os avanços nas técnicas de diagnóstico, com o maior interesse em reproduzir certas raças de gatos em países desenvolvidos e/ou parcialmente, com uma maior preocupação a nível de saúde e cuidados dedicados aos animais de estimação (Simões-Mattos *et al.*, 2005).

Na maioria dos trabalhos realizados a detecção da infecção por *L. infantum* apresentou uma sensibilidade muito superior através da técnica de PCR do que através da detecção de anticorpos específicos. Nos estudos em que se compararam os resultados obtidos com as técnicas serológicas e moleculares não se observou uma associação entre os mesmos, excepto nos trabalhos realizados por Pennisi (2002) e Sherry (2011) (Maia & Campino, 2011).

No que diz respeito à Leishmaniose, o vector é o agente focalizador da doença. A existência de focos zoonóticos ou antroponóticos está limitada à presença do vector específico do parasita, à sua distribuição, à sua capacidade de dispersão, à existência de hospedeiros vertebrados infectados e às condições climáticas (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Os flebotómíneos apresentam susceptibilidade e competência vectorial para uma ou mais espécies de *Leishmania*, dependendo da capacidade de ligação específica das formas promastigotas aos receptores do aparelho digestivo do insecto (Baneth *et al.*, 2008; Afonso & Alves-Pires, 2008).

Rastreios epidemiológicos no território continental demonstraram que *P. papatasi* é pouco frequente no país, *P. sergenti* é mais frequente no sul, nomeadamente na região de Évora e que *Sergentomya minuta* é mais abundante no Algarve, existindo em menor número na região do Alto Douro. As espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi* são os vectores biológicos comprovados de *L. infantum* no nosso país. A primeira espécie é a principal espécie vectora da Leishmaniose humana e canina, protagonismo que partilha de forma pontual com *P. ariasi* na região do Alto Douro, sendo nos outros focos endémicos considerada a espécie dominante (Alves-Pires, 2000).

Estudos realizados sobre o padrão de alimentação dos flebótomos mostraram que a espécie *P. perniciosus* se alimenta em cães, coelhos, ovelhas, galinhas e no Homem (Rossi *et al.*, 2008). Em 2007, Maroli *et al.*, demonstraram pela primeira vez que os gatos podem ser uma fonte de alimentação para os flebótomos. Submetendo um gato infectado cronicamente com *L. infantum* testado por IFI com uma titulação de anticorpos 1/160, a xenodiagnóstico,

confirmou-se que este era infeccioso para o vector, demonstrando taxas de infecção similares às que são obtidas em cães sintomáticos quando submetidos às mesmas condições.

5.1. Leishmaniose Felina em Portugal

O primeiro caso de Lfel foi reportado em 1994, por Costa Durão *et al.*, numa gata adulta proveniente de Sesimbra que possuía um nódulo cutâneo na região supraorbital esquerda (Figura 7). Já no século XXI, foram reportados mais dois casos, ambos em 2009, um por Marcos *et al.*, numa gata de 4 anos que se apresentou à consulta com sinais inespecíficos como anorexia e depressão; e o outro por Sanches *et al.*, que diagnosticaram Lfel num gato com 7 anos de idade, com alopecia extensa, descamação e prurido generalizado e ainda conjuntivite bilateral, uveíte no olho esquerdo e uma úlcera no plano nasal.

Não se previa, nos três animais o diagnóstico de Lfel devido à dificuldade em distinguir o quadro clínico de outras doenças mais comuns (virais, tumorais e fúngicas) nos felinos (Silva, Cândido, Pereira, Brazil, Carreira, 2008). No entanto, no primeiro caso optou-se pela exérese da lesão que após exame histopatológico confirmou formas amastigotas de *Leishmania*, no segundo foram observadas numa citologia de um linfonodo e por fim no terceiro caso em esfregaços de sangue e na medula óssea (Figura 8).

Figura 7. Nódulo cutâneo na região da cabeça (seta) antes da sua extirpação

(Adaptado de Costa-Durão *et al.*, 1994)

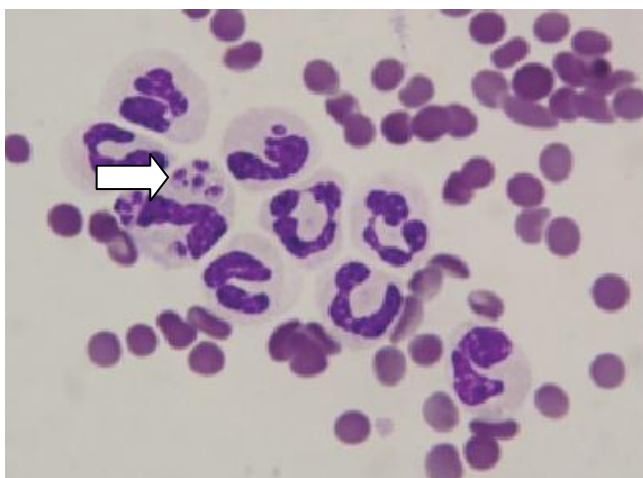


Figura 8. Esfregaço de sangue de um gato diagnosticado com Lfel. Formas amastigotas de *Leishmania* presentes no interior de neutrófilos (seta)
(Ampliação: 1000x)

(Adaptado de Marcos *et al.*, 2009)

Em todos os casos foi realizada terapêutica. No primeiro caso o tratamento específico de Leishmaniose foi efectuado com Antimoniato de N-metilglucamina (na dose de 1,25 mL IM, num total de 20 injeções em dias alternados). O tratamento instituído foi bem tolerado e ocorreu uma melhoria do quadro clínico. No segundo caso, apesar do tratamento (transfusão sanguínea e administração de Alopurinol e de Nandrolona), o estado clínico piorou e a gata foi eutanasiada. Na necrópsia, a disseminação visceral do parasita foi confirmada. No caso de Sanchez *et al.* (2009) no tratamento inicial foi aplicada uma pipeta de Advocate® (associação de Imidaclopride com Moxidectina), Alopurinol numa dose de 10 mg/Kg BID e Conjuntilone-S® (Neomicina, Polimixina B e Prednisolona). Duas semanas depois o paciente apresentava melhoras significativas.

Não só em Portugal, mas também na Europa, nos últimos anos, o interesse pela Lfel tem vindo a aumentar. No nosso País, embora o primeiro caso tenha sido reportado na década de 90, nos últimos dez anos têm sido realizados com maior interesse vários rastreios epidemiológicos de Leishmaniose em que o gato adquire o principal protagonismo (Tabela 4). Em 2005, Vaz *et al.*, realizaram uma pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica da IFI em gatos errantes da região de Lisboa onde apenas um (1,03%) em 97 animais foi positivo (diluição de 1:160).

Já Faria (2008), no concelho de Vila Franca de Xira (AML), efectuou um estudo epidemiológico em 50 gatos domésticos e 25 gatos de gatil. Contudo, nenhum dos felinos apresentou resultados positivos para anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de IFI (diluições de 1:40 e 1:80).

Rosa (2009), efectuou um estudo epidemiológico, na Área Metropolitana de Lisboa, por IFI (diluições de 1:40 e 1:80) em 70 gatos, onde constatou que todos os animais eram negativos, obtendo assim uma prevalência de infecção por *L. infantum* de 0% (0/70 gatos).

Nos dois estudos elaborados por Maia *et al.* (2008 e 2010), nas regiões de Lisboa e Setúbal, observaram-se, por detecção de ADN, prevalências de infecção de 30,4% (7/23) nos gatos errantes e de 20,3% (28/138) em gatos domésticos. A maioria dos animais não apresentava sinais clínicos e a detecção de anticorpos através de IFI foi de 1,32% (Maia *et al.*, 2010).

Também em 2010, num rastreio epidemiológico nas sub-regiões de Trás-os-Montes e Alto Douro, Cardoso *et al.*, verificaram que no total de 316 gatos, 9 apresentaram seropositividade tanto pela técnica de ELISA como por TAD, aferindo uma seroprevalência de infecção por *Leishmania* de 2,8%.

Duarte *et al.*, (2010), na Área Metropolitana de Lisboa observaram os valores de seroprevalência mais baixos de todos os rastreios documentados, num estudo de 180 gatos,

dos quais apenas num (0,6%) detectaram anticorpos anti-*Leishmania* através da técnica de IFI (titulação de 1:40).

Oliveira (2011), pesquisou infecção por *L. infantum* em 50 gatos de uma Associação na Região de Setúbal (através de *real-time* PCR em sangue total periférico), tendo ocorrido detecção do ADN do agente em apenas um animal testado (2% com IC 95% de 0,1 - 10,5%). Todos estes estudos epidemiológicos e os casos reportados de Lfel confirmam que gatos são susceptíveis à infecção por *Leishmania* e podem ser afectados pela doença. Além disso e de um modo mais preocupante, são capazes de transmitir o protozoário aos vectores (Maroli *et al.*, 2007), o que contribui assim para a propagação e transmissão da doença.

6. Patogenia e Lesões

O parasita na sua evolução adquiriu mecanismos de resistência em ambos os seus hospedeiros, contra a digestão enzimática no insecto e contra a resposta imunitária inata dos mamíferos (Leifso, Freue, Dogra, Murray & McMaster, 2007) o que lhe concedeu a importância mundial que lhe é atribuída hoje em dia.

Dos factores dependentes do parasita, o mais importante é a espécie e dentro desta, o perfil enzimático, considerando-se que diferentes perfis enzimáticos apresentam diferentes graus de virulência e antigenicidade, provocando diferentes respostas no hospedeiro. Na sua superfície, o parasita expressa vários glicoconjugados que, para além de fixarem opsoninas, podem ligar-se directamente a proteínas do macrófago. Entre aqueles, destacam-se a Glicoproteína 63 (GP63) e o Lipofosfoglicano (LPG) que são considerados os factores de virulência essenciais (Tomás & Freitas Romão, 2008).

No hospedeiro vertebrado, podemos considerar como factores primários, a constituição genética e directamente relacionado com esta, a resposta imunitária, que condicionam a resistência ou a fragilidade à infecção.

Para os cães existe um amplo número de estudos descritos sobre a resposta imune e manifestações clínicas da Leishmaniose. De um modo muito resumido, a patogenia da Leishmaniose canina pode ser dividida em duas respostas principais: (1) imunidade protectora mediada pelas células T CD4⁺, pela libertação de IFN- γ , IL-2 e TNF- α que induz actividade anti-*Leishmania* pelos macrófagos e (2) susceptibilidade à doença associada a uma marcada resposta imunitária humoral não-protectora e uma fraca imunidade mediada por células com uma resposta mista de linfócitos Th₁ e Th₂ (Baneth *et al.*, 2008; Alexandre-Pires *et al.*, 2010). De referir que o principal mecanismo que ocorre no interior dos macrófagos para destruir os parasitas é a produção de radicais livres de oxigénio, principalmente o óxido nítrico.

A presença do parasita no cão pode provocar dois tipos de lesões graves, consoante os mecanismos patogénicos predominantes, que são o desencadeamento de reacções inflamatórias granulomatosas e a produção de imunocomplexos circulantes que se depositam em várias estruturas tais como os glomérulos renais, os vasos sanguíneos e as articulações (Alexandre-Pires & Correia, 2008). Nos felinos estão descritos casos em que a invasão dos parasitas nos órgãos alvo, desencadeou uma resposta inflamatória granulomatosa difusa caracterizada por um infiltrado de células mononucleadas, predominantemente macrófagos com um elevado número de formas amastigotas no seu interior, e um número variável de linfócitos e plasmócitos (Hervás *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2010; Maia & Campino, 2011).

As alterações histopatológicas esplénicas, hepáticas e renais observadas foram: (1) desorganização da polpa branca esplénica, com poucos linfócitos em redor da arteríola central e aumento do número de macrófagos na polpa vermelha; (2) infiltração intersticial renal e (3) infiltração hepática periportal rica em macrófagos parasitados, linfócitos e plasmócitos (Maia & Campino, 2011).

Em felinos, embora haja pouca informação sobre a resposta imunitária contra a *Leishmania* spp. foi realizado um estudo acerca de resposta imunitária local desenvolvida contra o protozoário. Rodriguez *et al.* (2002), analisaram imunohistoquimicamente um infiltrado celular e as citoquinas associadas à infecção por *Leishmania* spp., em lesões cutâneas, oculares e orais de um felino co-infectado por FIV. As lesões granulomatosas oculares e cutâneas demonstraram à sua periferia um elevado número de linfócitos CD3⁺, de células plasmáticas, macrófagos e células gigantes multinucleadas, com formas amastigotas de *Leishmania* no seu interior, que juntamente com uma expressão elevada de antígenos-MHC classe II, evidenciam uma boa resposta imunitária local (tipo IV), que poderá ser a responsável pelo controlo da infecção por *Leishmania* em felinos e por impedir a sua disseminação sistémica (Rodriguez *et al.*, 2002).

Alguns autores, afirmam que a baixa prevalência de infecção em gatos em áreas endémicas de Leishmaniose se deva ao facto de estes animais possuírem um elevado grau de resistência natural ao parasita. Por outro lado, a manifestação mais comum da doença em gatos não é a forma visceral, mas sim a cutânea o que explica baixa produção anticorpos contra a *Leishmania* (Solano-Gallego *et al.*, 2007).

7. Diagnóstico

O diagnóstico de Leishmaniose felina deve ser baseado numa abordagem integrada, considerando a história, os sinais clínicos, os resultados de análises laboratoriais básicas e de testes de diagnóstico que detectam o parasita ou a avaliação da resposta imunitária do animal. Várias técnicas de diagnóstico, individualmente ou em combinação, têm sido aplicadas para pesquisa de *Leishmania* spp. em estudos de seroprevalência ou em casos de confirmação de Lfel.

7.1. Quadro Clínico

As características clínicas associadas à infecção por *L. infantum* não são patognomónicas e podem ser confundidas com outras doenças mais comuns do gato, o que tem contribuído provavelmente para uma considerável subestimação desta condição (Navarro *et al.*, 2010). O estado clínico geralmente encontrado corresponde à forma cutânea com dispersão visceral do parasita (Martín-Sánchez *et al.*, 2007). A cabeça, pavilhões auriculares e o nariz, em particular, são as regiões mais afectadas no corpo do gato (Mancianti, 2004), o que é coerente com a predisposição dos flebotómíneos para se alimentarem nas regiões do corpo que carecem de pêlo (Figura 9).

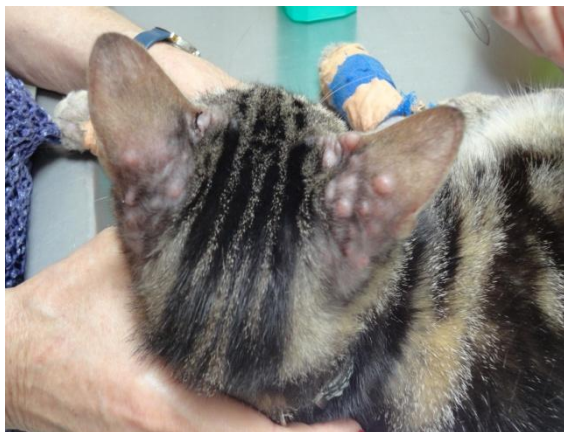


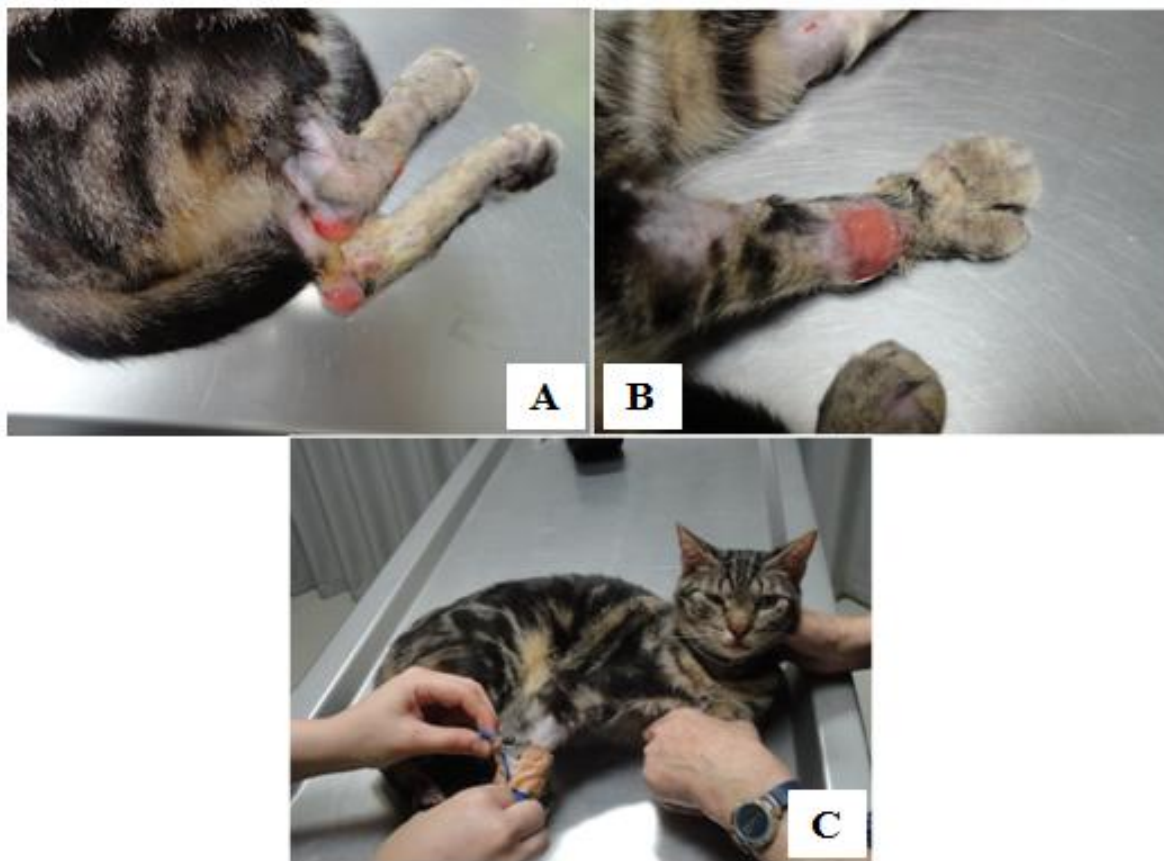
Figura 9. Nódulos cutâneos nos pavilhões auriculares de um gato com Lfel

(Cortesias da Dra. Alexandra Basso – Hospital Veterinário FMV/UTL)

Em regiões endémicas, há uma grande percentagem de animais saudáveis que podem desenvolver parasitémia mas que não apresentam sinais clínicos (Martin-Sanchez *et al.*, 2007), como concluíram Maia *et al.* (2008) num estudo realizado em felinos no nosso País. Quando presente o quadro clínico observado na Lfel é geralmente inespecífico sendo contudo, a anorexia, a perda de peso, a estomatite, a dermatite, a prostração, a diarreia e o vômito, alguns dos primeiros sinais a serem observados (Maia & Campino, 2011). As lesões mais frequentes são as cutâneas - nódulos ulcerados e/ou com crosta, pápulas, pústulas e alopecias focais ou generalizadas não pruriginosas (Costa-Durão *et al.*, 1994; Ozon *et al.*, 1998; Hervás

et al., 1999; Poli *et al.*, 2002; Pennisi *et al.*, 2004; Simões-Matos *et al.*, 2004; Huebner *et al.*, 2008; Marcos *et al.*, 2009; Maia e Campino, 2011; Romero, Crespo & Llinares, 2012) (Figura 10, 11).

Figura 10. Lesões dermatológicas de um gato com Lfel
(Cortesia da Dra. Alexandra Basso – Hospital Veterinário FMV/UTL)



Legenda: A – Lesões ulcerativas nos membros posteriores num gato diagnosticado com Lfel; B – Nódulo ulcerado no membro anterior direito de um gato com Lfel; C – Aspecto do gato diagnosticado com Lfel no dia do diagnóstico.

Aquando do exame oftalmológico de gatos suspeitos concluiu-se que as formas amastigotas apresentavam tropismo para o sistema ocular (Leiva *et al.*, 2005). Deste modo, foram documentados lesões como uveítes, coriorretinites, conjuntivites, blefarites e queratites (Pennisi *et al.*, 2004; Leiva *et al.*, 2005; Baneth *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2010) (Figura 13). Embora os sinais viscerais não sejam tão comuns, sinais como linfadenopatia focal ou generalizada, hépato e/ou esplenomegália e insuficiência renal foram já documentados (Hervás *et al.*, 1999; Poli *et al.*, 2002; Pennisi *et al.*, 2002; Simões-Matos *et al.*, 2004; Mancianti, 2004; Baneth, 2006; Navarro *et al.*, 2010).

No quadro clínico laboratorial, das alterações hematológicas mais frequentes destacam-se a anemia não regenerativa, a leucopénia, a trombocitopénia e o aumento da ureia e da creatinina.



Figura 11. Crostas, pápulas, despigmentação e eritema da trufa de um gato com Lfel
(Adaptado de Rüfenacht *et al.*, 2005)

Em todos os casos reportados observou-se o aumento das proteínas totais sanguíneas, mais particularmente das gamaglobulinas (Ozon *et al.*, 1998; Poli *et al.*, 2002; Pennisi *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2012).

A infecção por *L. infantum* já foi encontrada na presença de outras alterações dermatológicas, como pênfigos foliáceo (Rüfenacht *et al.*, 2005) e carcinoma das células escamosas (Grevot *et al.*, 2005). Por esta razão, quando um gato apresentar nódulos cutâneos ulcerados ou/e com crostas deve adicionar-se como diagnóstico diferencial a pesquisa de infecção por *Leishmania* spp., principalmente em áreas onde a doença é endémica.



Figura 12. Uveíte e coágulo de fibrina na câmara anterior do olho esquerdo de um gato com Lfel (seta)
(Adaptado de Pennisi, 2002)

7.2. Diagnóstico Laboratorial

7.2.1. Observação morfológica do parasita

Os métodos de diagnóstico que permitem a visualização do parasita, como a citopatologia e a histopatologia consistem na demonstração da forma amastigota do parasita através de esfregaços corados de material biológico, nomeadamente medula óssea, baço, linfonodos, pele ou sangue periférico que posteriormente são observados e identificados ao microscópio óptico (Maia & Campino, 2008; Srivastava, Dayama, Mehrotra & Sundar, 2011; Srividya, Kulshrestha, Singh & Salotra, 2012). São consideradas técnicas vantajosas e a melhor forma de diagnóstico (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008), uma vez que são capazes de detectar directamente o parasita e são de execução economicamente acessível (Srividya *et al.*, 2012). A especificidade desta técnica é elevada, embora a sensibilidade varie consoante a amostra utilizada, sendo referido para o cão valores de 93-99% para o baço, 53-86% para a medula óssea e 53-65% para os linfonodos (Siddig *et al.*, (1988) citado por Srivastava *et al.*, 2011).

Nas preparações coradas com os corantes Giemsa ou Leishman as formas ovóides/redondas (\varnothing 2-4 μ m) do parasita apresentam-se com o citoplasma azul claro e um núcleo relativamente grande corado de vermelho. Em alguns ângulos é possível observar o cinetoplasto com uma coloração violeta/vermelho (Maia & Campino, 2008; Gramiccia, 2011; Srivastava *et al.*, 2011). A carga parasitária pode ser avaliada, no esfregaço, pela contagem do número de parasitas em relação ao número de leucócitos existentes (Maia & Campino, 2008). O aparecimento de apenas uma célula parasitada é considerada como um resultado positivo à infecção (Corrales & Moreno, 2006).

Histopatologicamente, análises coradas com hematoxilina/eosina (HE) também têm sido usadas para detectar a presença do parasita. A histopatologia de lesões apresenta uma vantagem no sentido em que, com um único fragmento de biópsia pode efectuar-se um diagnóstico diferencial com outras patologias, como por exemplo: carcinoma de células escamosas no caso do gato. No entanto, a sensibilidade para o diagnóstico de Leishmaniose é bastante variável (Lunedo, Thomaz-Soccol, Castro & Telles, 2012). No que diz respeito ao diagnóstico etiológico da doença, a detecção directa do parasita em cortes e/ou esfregaços, corados com HE, de órgãos linfóides é mais eficaz em gânglios linfáticos poplíteos, seguidos pelo baço e depois pela medula óssea. Contudo, a abordagem por imunohistoquímica provou ser mais sensível para a detecção de parasitas quando comparada com a avaliação de rotina

histológica, especialmente em linfonodos (Moreira, Luvizotto, Garcia, Corbett & Laurenti, 2007).

Imunocitoquímica e imunohistoquímica (ICQ/IHQ) são definidas como metodologias que usam anticorpos associados a marcadores para localizar e identificar antígenos em diferentes tecidos (Lunedo *et al.*, 2012). O recurso a técnicas como IHQ, imunoperoxidase ou imunofluorescência direta de tecidos tendem a ser utilizadas como uma ferramenta suplementar para confirmar o diagnóstico em HE (Miró *et al.*, 2008), particularmente em órgãos que não têm alta carga parasitária (Maia & Campino, 2008) (Figura 13).

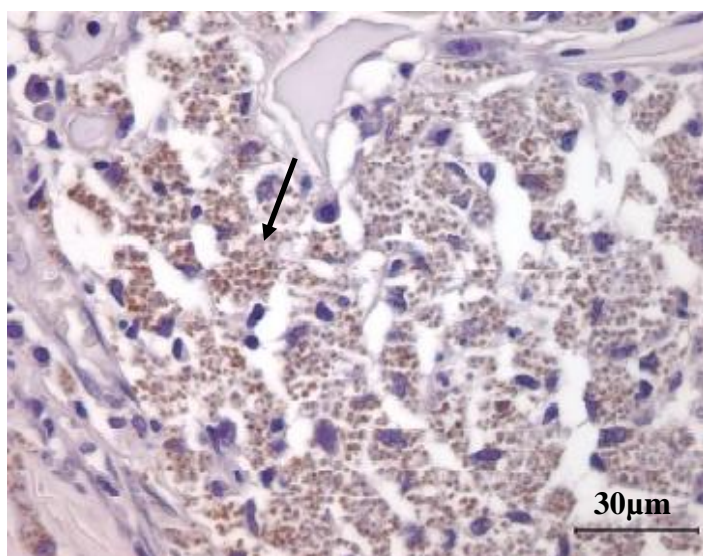


Figura 13. Queratite em um gato: Secção evidenciando um elevado número de formas amastigotas de *Leishmania* (seta) no interior do citoplasma de numerosos macrófagos. IHC.

(Adaptado de Navarro *et al.*, 2010)

Num estudo efectuado por Rosa (2009), onde o autor compilou a informação de 49 casos clínicos de Lfel a nível mundial até 2009, constatou-se que em 45 casos clínicos foram utilizados exames citológicos ou histológicos para a observação microscópica de formas amastigotas de *Leishmania* e confirmar assim o diagnóstico de infecção. O parasita foi observado com maior frequência em lesões cutâneas (n= 29), mas também em linfonodos (n= 15), na medula óssea (n= 5), no fígado (n= 3), no baço (n= 3), nos olhos (n= 2), no sangue (n= 2) e no intestino e estômago (n= 1).

7.2.2. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania*

Os métodos serológicos consistem na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro sanguíneo de animais/pessoas e constituem o instrumento essencial para o diagnóstico de infecção por *Leishmania* spp. no homem e nos cães. São métodos com alta sensibilidade e especificidade, cuja principal limitação é a incapacidade de diagnosticar a doença quando não se produzem anticorpos, durante o período de seroconversão e em doentes assintomáticos (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Gramiccia, 2011).

Investigações serológicas preliminares revelaram que gatos infectados por *Leishmania* frequentemente desenvolviam um baixo nível de anticorpos ou permaneciam seronegativos (Poli *et al.*, 2002; Martín-Sánchez *et al.*, 2007). A falta ou baixa produção de anticorpos específicos sugere que a serologia convencional não é suficientemente fiável em gatos (Maia e Campino, 2011) e a presença de anticorpos não implica o desenvolvimento da doença. Martín-Sánchez *et al.* (2007) verificaram que felinos com títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. mais elevados apresentavam menor ocorrência de positividade pela técnica de PCR. Por outro lado, houve maior proporção de positividade com PCR em felinos com baixas concentrações séricas de tais anticorpos. Não obstante, alguns autores sugerem uma resposta imunitária felina diferente daquela que ocorre nos cães, o que pode explicar a baixa ocorrência de felinos assintomáticos, uma vez que a resposta imune do tipo celular é um indicativo de resistência à infecção por *Leishmania* spp. (Vita *et al.*, 2005; Baneth *et al.*, 2008; Maia & Campino, 2011). Dos vários tipos de técnicas serológicas, destacam-se as mais importantes como o teste de imunofluorescência indirecta (IFI), o ensaio imunoenzimático ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" – ELISA), o teste de aglutinação directa ("Direct Agglutination Test" – TAD), e imunotransferência ("Western Blot" – WB) (Greene, 2006; Maia & Campino, 2008; OIE, 2008; Srivastava *et al.*, 2011; Srividya *et al.*, 2012).

Todas estas técnicas sofrem de duas limitações: (1) os anticorpos específicos permanecem detectáveis até vários anos após a cura, o que significa que a reincidência diagnosticada por serologia não é totalmente fidedigna, e (2) uma proporção significativa de animais/pessoas saudáveis que vivem em áreas endémicas sem história de LV, são positivos por exibirem anticorpos anti-*Leishmania* devido a infecção (WHO, 2010).

Assim sendo, o diagnóstico de LVZ não deve ser efectuado com base apenas em métodos serológicos, deve ser complementado com outros métodos (parasitológicos e/ou moleculares). Na Leishmaniose canina, o diagnóstico clínico é fundamental. O quadro clínico que se desenvolve, juntamente com os dados epidemiológicos da região, a anamnese, o exame físico e as alterações bioquímicas, constituem a primeira opção válida para o diagnóstico de Lcan, o mesmo não acontece com os gatos. As características clínicas associadas à infecção felina por *L. infantum* podem ser confundidas com outras doenças mais comuns nesta espécie e falta de informação desta doença nos gatos pode levar a uma subestimação desta condição.

7.2.2.1. Técnica de Imunofluorescência Indirecta (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A IFI é considerada o “gold standard” do diagnóstico serológico de LVZ. Para a Lcan e Lhum é considerado um teste com elevada sensibilidade (83% - 100%) e especificidade (74% - 100%) para doentes sintomáticos. Contudo, apresenta desvantagens que incluem a baixa sensibilidade em pacientes assintomáticos, reacções cruzadas com outros agentes patogénicos como *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp. e *Toxoplasma* spp. e a exigência de um microscópio de fluorescência (OIE, 2008; Miró *et al.*, 2008; Gomes, Paiva Cavalcanti, Lira, Abath & Alves, 2008).

Este método baseia-se na formação de imunocomplexos formados pelos antígenos figurados fixos ao suporte sólido de fixação com os anticorpos específicos existentes no soro do animal. Posteriormente, adiciona-se um anticorpo anti-espécie conjugado com um fluorocromo que permite observar os resultados finais num microscópio de fluorescência.

O antígeno mais utilizado nesta técnica é constituído por formas promastigotas inteiras cultivadas *in vitro* (Maia & Campino, 2008), porém, na infecção natural, o hospedeiro vertebrado reage imunologicamente com as formas amastigotas do parasita (Boarino, Bollo, Prunotto, Canale, Uslenghi & Poletti, 2008). Em concordância com o anterior, num estudo realizado por Fernández-Pérez *et al.* (1999) é referido que a reacção sobre amastigotas é mais sensível em casos assintomáticos e com baixos títulos de anticorpos específicos (Cardoso, 2004).

Nos caninos, títulos elevados de anticorpos indicam a presença de doença activa e potencial transmissão dos protozoários aos vectores. Todavia nos gatos são detectados títulos de anticorpos normalmente inferiores aos detectados na LCan (Poli *et al.*, 2002; Maia & Campino, 2011).

A ELISA utilizada no diagnóstico de Leishmaniose, permite igualmente a detecção de anticorpos específicos, utilizado um antígeno solúvel adsorvido a uma superfície de plástico sobre o qual são colocados os soros suspeitos. A evidenciação dos complexos antígeno/anticorpo é efectuada pela adição de um conjugado anti-espécie ligado a uma enzima, do substrato enzimático e de um cromógeno, desencadeando uma reacção enzimática demonstrada pelo aparecimento de cor. De acordo com a literatura, os valores de sensibilidade variam entre 86%-99% e os da especificidade entre 94%-99,5%, apresentando maior interesse para a realização de rastreios epidemiológicos por serem analisadas um elevado número de amostras (Gomes *et al.* 2008; Maia & Campino, 2008; Srivastava *et al.*, 2011).

Existem duas variações na detecção dos complexos antígeno/anticorpo relativamente ao diagnóstico de Leishmaniose/ infecção por *Leishmania*: (1) detecção através de anti- IgG, ou (2) detecção através de proteína A conduzindo a duas abordagens possíveis, uma pela técnica de ELISA-IgG e a outra por ELISA-Proteína A (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008).

Solano-Gallego *et al.* (2007) no noroeste da Bacia Mediterrânea, averiguaram a seroprevalência de Leishmaniose visceral em 445 gatos através da técnica ELISA-proteína A e ELISA-IgG e aferiu valores de 6,29% e 5,25%, respectivamente. Também Costa (2008), no Brasil, avaliou do mesmo modo 200 gatos, dos quais oito (4%) apresentavam formas amastigotas de *Leishmania*. no exame parasitológico direto, nove (4,5%) possuíam serologia positiva pela técnica de ELISA-proteína A e 23 (11,5%) pela técnica de ELISA-IgG. Dos oito animais positivos ao diagnóstico parasitológico, apenas um (12,5%) apresentou sorologia positiva por ELISA-proteína A e dois (25%) por ELISA-IgG, havendo positividade simultânea nos três testes em apenas um gato (12,5%). As concordâncias então observadas pelo diagnóstico parasitológico e pelas técnicas de ELISA foram consideradas fracas segundo o coeficiente kappa. Os resultados discordantes de ambos os autores supracitados estão relacionados com o desenvolvimento da metodologia utilizada e com o tipo de cromogénio usado na reacção. Contudo, o recurso à utilização da proteína A tem como vantagem o facto de poder ser utilizado com soros de outros animais, visto não apresentar especificidade entre espécies como é o caso do Anticorpo anti IgG de espécie.

Nesta técnica o tipo de antígeno influencia a precisão dos ensaios serológicos. Antígenos totais ou recombinantes têm sido descritos para diagnosticar a Lcan e Lhum por ELISA (OIE, 2011). Neto *et al.*, (2011), efectuaram um estudo onde utilizaram antígenos brutos (CAG-ELISA), purificados (glicoproteína ligante de fucose e manose – FML) e recombinantes (rK39) pela técnica de ELISA em gatos. Estes autores constataram que o antígeno em bruto identificou o maior número de possíveis amostras seropositivas. Geralmente, uma variedade maior de epítomos são detectados quando antígenos brutos são utilizados, contudo a probabilidade de ocorrerem reacções cruzadas com outros agentes patogénicos torna-se superior (Cândido *et al.*, (2008) citado por Neto *et al.*, 2011).

Em rastreios epidemiológicos de Lfel têm sido utilizados o diagnóstico parasitológico em sinergia com as técnicas serológicas. Rossi *et al.* (2011), testaram 200 gatos e 13 foram considerados positivos (1 por IFI; 6 por ELISA e 8 por observação directa do parasita em amostras). Vides *et al.* (2011) num estudo em 55 gatos, 27 acusaram positividade (6 por IFI,

14 por ELISA e 12 através de métodos parasitológicos), mostrando assim, que o título de anticorpos não está associado à infecção activa.

A ausência ou baixa concentração de anticorpos anti-*Leishmania* verificados em vários estudos de Lfel tem, como consequência, a subestimação do real número de casos de animais infectados, facilitando assim a transmissão e disseminação do parasita (Maia & Campino, 2011).

7.2.3. Detecção de ADN de *Leishmania*

A Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) consiste num método sensível, fiável e rápido para o diagnóstico de Leishmaniose. Actualmente, ensaios baseados nas técnicas de PCR constituem a principal abordagem molecular de diagnóstico (Srivastava *et al.*, 2011). Estas permitem amplificar quantidades mínimas de ADN (ácido desoxirribonucleico) do parasita através da utilização de sequências iniciadoras específicas (*primers*) (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Maia & Campino, 2008). Os “*primers*” são seleccionados a partir de uma pequena subunidade de um gene de rRNA (ácido ribonucleico ribossómico), de minicírculos de ADN do cinetoplasto ou de sequências altamente repetitivas de ADN genómicas, procedendo-se, no final, à análise dos produtos amplificados (Gramiccia, 2011).

A técnica de PCR pode ser realizada extraíndo ADN de diversos materiais biológicos (sangue, fluidos biológicos e até mesmo de amostras histopatológicas) (Solano-Gallego *et al.*, 2009), consoante os quais oscila a sensibilidade e especificidade da técnica. Deste modo, em ensaios realizados em cães, a técnica de PCR em tecidos como medula óssea, linfonodos, baço ou pele é mais sensível e específica para o diagnóstico de LCan quando comparadas com amostras de sangue total, buffy coat, e urina que apresentam uma menor sensibilidade (Maia, Ramada, Cristóvão, Gonçalves & Campino, 2009). Não obstante, estes protozoários apresentam maior tropismo para a medula óssea, para os linfonodos, para o baço e para a pele, assim a carga parasitária nestes tecidos/órgãos será sempre superior.

Estudos realizados em felinos acentuam o facto de a técnica de PCR quando aplicada em sangue, tal como acontece nos canídeos, não ser o melhor local de pesquisa, pois as formas amastigotas dificilmente se encontram em circulação (Maia & Campino, 2011), destacando a medula óssea e linfonodos como o melhor local de pesquisa do agente nos gatos (Vita, Santori, Aguzzi, Petrott & Luciani, 2005). Nos casos clínicos reportados a nível mundial de Lfel, os tecidos utilizados na técnica da PCR foram o sangue (n = 5), o tecido cutâneo lesionado (n = 4), os linfonodos (n = 3), a medula óssea (n = 2) e o baço (n = 1) (Rosa, 2009).

Na maioria dos trabalhos realizados em gatos a detecção da infecção por *L. infantum*, apresentou níveis de positividade muito superior através da técnica do PCR do que através da detecção por anticorpos específicos (Maia & Campino, 2011). Torna-se essencial referir que não é correcto comparar a detecção de anticorpos (Ac) com a detecção de antígeno (Ag), especialmente em uma doença em que a imunidade celular é particularmente importante. Além disso a detecção de Ac serve para a identificação de animais que contactaram com o parasita, enquanto que a detecção de Ag permite a identificação dos animais que têm, e transportam *Leishmania* spp.

7.2.3.1. Técnicas de PCR-RFLP e qPCR

Diferentes técnicas têm sido descritas para melhorar tanto sensibilidade como a especificidade do método convencional de PCR. Tais como a PCR-RFLP (Restriction Fragment length Polymorphism) e também a PCR em tempo real (qPCR) que demonstram ser mais sensíveis. O qPCR tem a vantagem adicional de poder aferir a cinética de infecção e a monitorização da resposta à terapêutica (Francino *et al.*, 2006).

Como principais desvantagens destas técnicas destaca-se o custo, na medida em que são executadas em laboratórios especializados, e o facto de que uma PCR positiva não implicar necessariamente que haja uma infecção activa, porque esta técnica detecta o ADN parasitário independentemente de se tratar de protozoários viáveis ou não (Maia e Campino, 2008).

Vários estudos têm relatado a eficiência do método PCR-RFLP na identificação e classificação de espécies de *Leishmania* directamente a partir amostras. Torna-se uma metodologia menos trabalhosa do que a análise isoenzimática, considerada o método padrão, pois evita a necessidade de isolamento do parasita (Abda *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2011).

A qPCR permite a amplificação exponencial de sequências específicas de ADN durante o decorrer da reacção. A partir da quantificação do ADN modelo, uma estimativa da carga relativa de parasitas em diferentes amostras pode ser obtida (Maia e Campino, 2008). Francino *et al.* (2006) verificaram que a técnica de PCR tradicional poderia ser positiva somente em amostras com cargas parasitárias superiores a 30 *Leishmania* spp./mL de amostra, enquanto o qPCR detectou concentrações acima de 0,2 parasitas/mL de amostra.

Na tabela 5 estão resumidas as vantagens e desvantagens de algumas das principais técnicas de diagnósticos utilizadas para diagnóstico de Leishmaniose/ infecção por *Leishmania*.

Tabela 5. Sumário das várias técnicas de diagnóstico de Leishmaniose/ infecção por *Leishmania* e as suas respectivas vantagens e desvantagens(Adaptado de Miró *et al.*, 2008 & Solano-Gallego *et al.*, 2011)

Técnicas de Diagnóstico	Vantagens	Desvantagens
Métodos Directos		
Citologia/ Histopatologia	Permite a visualização directa do parasita e identificar o tipo de patologia; Permite a exclusão de outros diagnósticos diferenciais;	Baixa sensibilidade para a detecção de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> em tecidos e no sangue; Requer a combinação com outras técnicas de diagnóstico (PCR e/ou IHQ) quando não são observados parasitas; Não revelam o estado imunológico do animal; São necessários técnicos especializados na detecção do parasita;
Culturas de <i>Leishmania</i>	Permite o isolamento do parasita; Facilita a identificação isoenzimática do parasita;	Trabalho moroso; Pode decorrer um mês até se obterem resultados; Realização em laboratórios especializados;
Método molecular - qPCR	Detecção de ADN de <i>Leishmania</i> ; Elevada sensibilidade e especificidade; Quantificação da carga parasitária;	Facilidade em contaminar o ADN; Não revela o estado imunológico do animal; Resultados positivos apenas indicam a presença do parasita e não a confirmação de desenvolvimento de doença; Variações nas técnicas utilizadas pelos diferentes tipos de laboratórios;
Métodos Indirectos		
IFI e ELISA	Determinam a resposta imunitária do animal à presença do parasita;	Animais imunodeprimidos podem apresentar uma concentração baixa de anticorpos; Determinação do <i>cut-off</i> varia entre laboratórios; Resultados subjectivos, dependem da experiência do operador; Não detecta a presença de <i>Leishmania</i> ; Reacções cruzadas com outros parasitas;

PCR: Reacção em cadeia da polimerase; qPCR: Reacção em cadeia da polimerase em tempo real; IHQ: Imunohistoquímica; IFI: Imunofluorescência Indirecta; ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

7.2.4. Outras Técnicas de Diagnóstico

7.2.4.1. Isolamento e culturas *in vivo* e *in vitro* de *Leishmania* spp.

O diagnóstico directo também pode ser feito recorrendo a culturas do parasita *in vivo* e *in vitro* a partir de tecidos infectados (Maia & Campino, 2008; Srividya *et al.*, 2012). A cultura *in vivo* pode ser realizada por inoculação de tecidos infectados em hamsters e monitorização posterior dos seus sinais clínicos. Esta técnica é utilizada, sobretudo, na área de investigação

(World Organisation for Animal Health [OIE], 2008; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Culturas *in vitro* apresentam algumas vantagens sobre os métodos *in vivo*: tornam-se positivas mais rapidamente (5-30 dias em comparação com o número de meses necessários para o aparecimento de lesões) e os materiais são menos dispendiosos (OIE, 2008). Contudo, nem todas as estirpes de *Leishmania* crescem à mesma taxa e nem todos os tecidos e órgãos provenientes do mesmo animal têm uma carga parasitária semelhante (Maia & Campino, 2008). Apesar de exibirem 100% de especificidade, as culturas são hoje em dia menos utilizadas para o diagnóstico (Miró *et al.*, 2008), devido às suas desvantagens, tais como atraso nos resultados, a susceptibilidade à contaminação microbiológica, dependência em relação à carga parasitária e às vezes dificuldade de realizar devido à má adaptação do isolado ao meio de cultura (Maia & Campino, 2008; Srividya *et al.*, 2012).

A escolha do método de isolamento, cultura e identificação dos parasitas irá depender das circunstâncias imediatas e sobretudo da técnica e experiência profissional dos técnicos de laboratório (Miró *et al.*, 2008).

7.2.4.2. Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico tem como fundamento detectar e isolar um agente patogénico utilizando os seus vectores artrópodes (Maia & Campino, 2008; Gramiccia, 2011).

A taxa de infecção reportada de flebotómíneos, nos cães situa-se entre os 21,9% e os 92%. Relativamente à *Lfel*, há um estudo efectuado onde se procedeu ao xenodiagnóstico. Em Junho de 2005, Maroli *et al.* (2007), submeteu um gato infectado cronicamente com *L. infantum* MON-1 a xenodiagnóstico com uma colónia de *P. perniciosus* criada em laboratório. O gato foi sedado e exposto à da picada de 100 flebotomíneos fêmea que após 90 minutos. Após 7 dias os insectos foram anestesiados e analisados ao microscópio. Os autores concluíram que de todas as fêmeas, 20 (20%) realmente se tinham alimentado no gato, e que de 19 dos flebotómíneos dissecados, 4 (21%) apresentavam formas promastigotas no interior do seu trato digestivo. Este foi o primeiro caso reportado que demonstra que o gato pode ser infeccioso para os vectores biológicos da doença.

Recentemente, Magno da Silva *et al.* (2010) realizaram um estudo muito semelhante no Brasil. Dos 100 flebotómíneos fêmeas (*Lutzomyia longipalpis*) que se alimentaram no gato, 84 foram dissecadas e analisadas 5 dias após a refeição sanguínea. Destes, 11/84 apresentaram valores de 1-200 formas promastigotas de *Leishmania infantum* no seu interior. Mais uma vez, é aqui colocado em causa o verdadeiro papel da espécie *Felis catus* no ciclo biológico de *L. infantum*.

Esta técnica, embora seja utilizada para resolver perguntas epidemiológicas importantes, é raramente utilizada no diagnóstico Lcan e Lfel, uma vez que só pode ser realizada em laboratórios especializados (Maia & Campino, 2008; Gramiccia, 2011).

7.2.4.3. Western Blot – WB

Este ensaio não é usado para diagnóstico de rotina, uma vez que requer conhecimentos técnicos avançados, é demorado e caro sendo utilizado mais na área de investigação (Ferroglia *et al.*, 2006). Permite detectar os anticorpos anti-*Leishmania*, assim como determinar a sua especificidade frente a diferentes fracções antigénicas do protozoário.

Apesar de ser uma técnica complexa e demorada, está indicada na resolução de casos duvidosos e para identificar animais assintomáticos, com baixos títulos serológicos (Maia & Campino, 2008).

7.2.4.4. Teste de Aglutinação Directa – TAD

No teste de aglutinação directa é utilizada para detecção de Ac por incubação do soro do animal em estudo com o antígeno particulado, sendo posteriormente feita a leitura visual do resultado (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Trata-se de uma técnica barata, de fácil de execução e com uma elevada sensibilidade (70,6-100%) e especificidade (84,9- 100%). O teste pode ser realizado utilizando plasma, soro, urina o que o torna adequado para o campo (uma vez que o antígeno se mantém estável a temperaturas elevadas) e de fácil aplicação em laboratório (Srividya *et al.*, 2011). Este método utiliza promastigotas inteiras, coradas, em suspensão ou liofilizadas. Uma das suas limitações é o tempo de incubação relativamente longo (18 horas) e o facto de não ser adequado para o rastreio de um grande número de amostras (Maia & Campino, 2008).

8. Tratamento

Embora não exista terapêutica protocolada para o tratamento da Lfel, alguns animais têm sido tratados com os fármacos utilizados para a Lcan com remissão do quadro clínico e reconversão dos parâmetros bioquímicos (Maia e Campino, 2011).

O tratamento clássico das Leishmaniose requer o uso de compostos como: os antimoniais pentavalentes (Antimoniato de Meglumina e Estibogluconato de Sódio), a Pentamidina, a Anfotericina B, a Aminosidina, os derivados do Imidazol (Ketoconazol, Metronidazol, Itraconazol e Secnidazol) a Miltefosina, o Alopurinol e as alilaminas (e.g. Terbinafina) (Meireles, 2008; Tiuman, Santos, Ueda-Nakamura, Filho & Nakamura, 2011) (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo de alguns fármacos utilizados no tratamento da Leishmaniose, o seu mecanismo de acção e os respectivos efeitos adversos e eficácia(Adaptado de Meireles, 2008 & Solano-Gallego *et al.*, 2011)

Nome	Mecanismo de acção	Eficácia e Toxicidade
Antimoniais pentavalentes (<i>e.g.</i> Antimoniato de Glucamina)	Destruição das leishmanias por bloqueio da síntese de ATP e GTP	Alguns casos com efeitos adversos: mialgia, vômito, diarreia, dor abdominal, apatia e alterações hepáticas, renais e pancreáticas; Recidivas por resistências ao tratamento
Diamidinas (<i>e.g.</i> Pentamidina)	Desorganização no metabolismo das proteínas e ácidos nucleicos, alterações nas mitocôndrias, ribossoma e cinetoplasto	Toxicidade superior e eficácia inferior em relação aos antimoniais
Análogos das purinas (<i>e.g.</i> Alopurinol)	Inibição das enzimas que realizam a seroconversão das purinas; Diminuição da síntese de ATP; Restrição da síntese proteica	Baixa toxicidade; não previne a infecção; não elimina o parasita em animais assintomáticos
Derivados do Imidazol (<i>e.g.</i> Ketoconazol)	Antifúngicos: Ligação aos esteróis das membranas celulares das leishmanias inibindo a sua síntese; Depleção das reservas glucogénicas; Inibição da síntese de ácidos nucleicos	Eficácia muito reduzida
Aminosidina	Antibiótico aminoglicosídeo: Inibição da síntese proteica das leishmanias	Ototoxicidade; Nefrotoxicidade; Associação com compostos antimoniais: potenciam a sua persistência a nível sanguíneo.
Miltefosina	Inibição da síntese da membrana celular das leishmanias; Actua sobre a formas promastigotas e amastigotas.	Indicado para animais com insuficiência renal; Associação com Alopurinol: compatibilidade e ausência de efeitos adversos e tóxicos.

Da compilação dos 49 casos clínicos de Lfel efectuada por Rosa (2009), procedeu-se à terapêutica em 13 gatos e em 54% dos quais obteve-se a cura clínica recorrendo a fármacos como (1) Antimoniato de Meglumina (3/13) em que 2 apresentaram cura clínica (num na medicação estava associado o Ketoconazol) e um apenas melhoras na sintomatologia; (2) Alopurinol (6/13) a cura clínica foi obtida em quatro, um morreu e o outro gato obteve melhoras significativas (associação da medicação com Itraconazol e Ketoconazol); (3) a

Pentamidina (2/13) num animal ocorreu a cura clínica e noutro ocorreu a morte; (4) o Fluconazole, o Clotrimazole, o Levamisole, a Aminosidina e o Metronidazol associado com Espiramicina também foram utilizados, porém, em todos os animais em que foram administrados não houve melhoras clínicas e ocorreu a morte.

Mais recentemente, num caso documentado de Lfel em Málaga (Espanha) por Romero *et al.* (2012), uma gata de 4 anos, sem vacinas e desparasitação em dia apresentava várias lesões cutâneas ulceradas não pruriginosas (de aparecimento progressivo), perda de peso, anorexia, tenesmo e prostração (Figura 14). Antes de inferir sobre o diagnóstico diferencial, efectuou-se uma citologia a partir de uma das lesões cutâneas e testou-se o animal para FIV/FelV, resultado que deu negativo. Procedeu-se então ao diagnóstico parasitológico (ao exame microscópico observou-se um padrão inflamatório com diversas formas amastigotas de *Leishmania* spp. no interior de macrófagos), serológico (IFI, com positividade numa titulação de 1:40) e molecular (qPCR, que apresentou 169 parasitas em 1 ml de sangue). Após o diagnóstico definitivo, deu-se início ao tratamento que se baseou em 20mg/kg de Alopurinol cada 24 horas monitorizando a evolução clínica do animal. Aos 21 dias de tratamento a gata recuperou o apetite, estava desperta, com menos alopecias, as lesões cutâneas tinham diminuído de tamanho e o desconforto intestinal tinha desaparecido (Figura 14).

Figura 14. Gato doméstico diagnosticado com Lfel no dia do diagnóstico (A) e 29 dias após tratamento com Alopurinol (B)
(Adaptado de Romero *et al.*, 2012)



Como o tratamento é um problema crescente, o desenvolvimento de novos medicamentos que podem substituir ou complementar as soluções terapêuticas disponíveis deve ser encorajado.

9. Profilaxia

A profilaxia deve ser centrada no combate aos vectores, no controlo de animais errantes e na determinação epidemiológica de outros animais que possam ser considerados reservatórios da doença (Meireles, 2008). Nos felinos a medicina preventiva está intimamente relacionada com o controlo dos insectos flebotómicos.

A redução do risco de infecção pode ser feita recorrendo ao uso de insecticidas, electrocutores e redes mosquiteiras pulverizadas com insecticidas à base de piretrinas ou permetrinas (Meireles, 2008). Para controlar o vector são normalmente utilizados insecticidas de acção residual - lindano (Killick-Kendrick, 1999). A pulverização com insecticidas é tipicamente limitada ao ambiente intra ou peri-domiciliar com o objetivo de reduzir as taxas de picadas de flebótomos no interior e ao redor das casas (Quinnell & Courtenay, 2009).

A luta ecológica, mediante desflorestação e reflorestação com espécies desfavoráveis (buganvílias, rícino ou limonete) para o crescimento de flebótomos é uma das maneiras utilizadas (Killick-Kendrick, 1999). Em algumas zonas da Índia, algumas espécies de flebotómicos já apresentaram resistências ao DDT, à Dieldrina, ao Malatão e à Permetrina (Mittal, Wijeyaratne & Pandey, 2004; Quinnell & Courtenay, 2009).

As medidas profiláticas directamente associadas ao felino consistem (1) em sensibilizar os donos a manter os animais dentro de casa, pelo menos nas primeiras horas do dia e ao anoitecer, (2) a utilização de um insecticida repelente, eficaz contra os flebótomos, nos animais que vivam em zonas endémicas (Meireles, 2008), no caso da espécie felina ainda não foi desenvolvido um antiparasitário com actividade sobre flebotómicos. Recentemente foi lançada a coleira Seresto[®] (possui efeito sinérgico entre o imidaclopride e a flumetrina) em cães e gatos, estando ainda a decorrer estudos para avaliar a eficácia repelente contra mosquitos e flebótomos. Ao ser comprovada, estaremos perante o primeiro antiparasitário para o gato com acção sobre os vectores biológicos de Leishmaniose.

10. Importância em Saúde Pública

Existem aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas com *Leishmania* spp. a nível mundial e cerca de 350 milhões estão em risco de adquirir esta doença, potencialmente fatal se não for estabelecido um tratamento (Baneth, 2006). Estima-se o aparecimento 1,6 milhões de novos casos por ano, dos quais 500 000 são da forma visceral. Destes 1,6 milhões de casos estimados, apenas cerca de 600 000 são relatados (WHO, 2010). Apesar de não ser evidente a relação directa entre a prevalência de Leishmaniose canina e da Leishmaniose humana, a

presença de cães infectados desempenha um papel importante na manutenção de endemia de LVZ (Campino & Maia, 2010).

Embora o cão seja o principal reservatório de *L. infantum* nos países da Bacia Mediterrânea, as prevalências de Lfel verificadas nos últimos anos e a considerável frequência com que os parasitas têm sido detectados no sangue periférico aliado ao facto dos gatos constituírem uma fonte alimentar dos flebótomos sugere a importância do gato como hospedeiro alternativo aos cães em zonas endémicas de Leishmaniose (Cardoso *et al.*, 2010; Maia & Campino, 2011). Casos documentados da infecção por *Leishmania* spp. mostram que animais infectados não apresentavam qualquer sinal ou sintoma de Leishmaniose, podendo ser um “transportador” saudável ou um caso curado (Simões-Mattos *et al.*, 2004) o que torna o gato relevante no papel de transmissão e disseminação da doença. Deste modo, mais estudos deverão ser realizados para que se possa esclarecer qual o verdadeiro papel do gato no ciclo biológico de *Leishmania* spp.

CAPITULO III- CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA INFANTUM* EM GATOS DOMÉSTICOS E ERRANTES NOS DISTRITOS DE LISBOA E VISEU

1. Objectivos

O estudo da infecção por *L.infantum* foi realizado num total de 80 gatos (40 gatos domésticos e 40 gatos errantes) nos distritos de Viseu e Lisboa no período compreendido entre 5 de Setembro de 2011 e 30 de Junho de 2012.

Este estudo teve como objectivos:

1. Detectar a presença de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* no soro;
2. Detectar a presença de ADN do protozoário no sangue;
3. Determinar e comparar a prevalência da infecção por *Leishmania infantum* em felinos nos distritos de Lisboa e Viseu;
4. Determinar a influência de diversos factores, entre eles, o habitat, a existência de co-infecção por FIV e FeLV, o contacto com cães, a origem do animal, uso de antiparasitários e a presença de doenças concomitantes;
5. Contribuir para o conhecimento sobre a infecção por este parasita nos gatos e o seu possível impacto na Saúde Pública.

2. Introdução

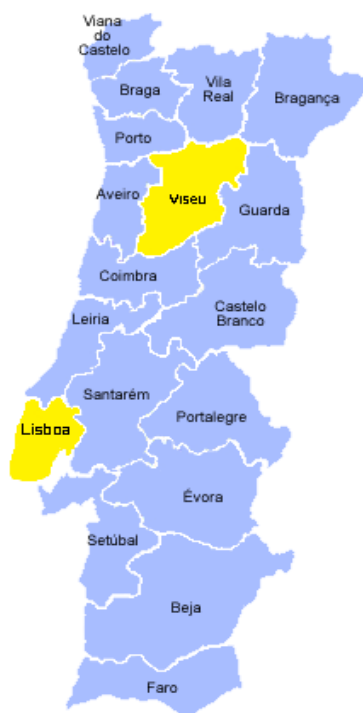
O presente estudo foi efectuado em dois distritos distintos: um situado na Região Centro-Norte, Distrito de Viseu, e o outro na Região Centro, o Distrito de Lisboa, mais particularmente na Área Metropolitana de Lisboa (AML) (Figura 15). Em cada distrito estudaram-se dois grupos (um grupo de gatos errantes e um de gatos domésticos).

A cidade de Viseu fica situada na Beira Interior, mais concretamente na província da Beira Alta, sendo simultaneamente capital desta província e do distrito.

O distrito de Viseu é composto por 24 concelhos: Viseu, Mangualde, Tondela, Vouzela, São Pedro do Sul, Castro Daire, Sátão, Penalva do Castelo, Vila Nova de Paiva, Nelas, Santa Comba Dão, Oliveira de Frades, São João da Pesqueira, Tarouca, Carregal do Sal, Mortágua, Tabuaço, Cinfães, Armamar, Lamego, Penedono, Resende, Moimenta da Beira e Sernancelhe (CENSOS, 2011). Neste distrito correm alguns rios, afluentes do rio Douro como é o caso dos rios Pavia, Torto, Távora, Varosa, Dão e, ainda, em algumas partes do distrito, o rio Mondego.

Figura 15. Mapa de Portugal Continental evidenciando os distritos onde foi efectuado o estudo epidemiológico

(Adaptado do site: <http://www.amoportugal.org/limparportugal/grupos/>)



O concelho de Viseu possui uma população de 99 274 habitantes atingindo a população do distrito os 377 629 habitantes numa área geográfica total de 507,20 km² (CENSOS, 2011).

A cidade é limitada, na sua totalidade, por trinta e quatro freguesias das quais, treze são predominantemente rurais, 13 são predominantemente urbanas e oito são mediantemente urbanas (Morais *et al.*, 2008). Viseu, como cidade localizada no encaixe entre as Regiões Norte e Centro de Portugal encontra-se rodeada pelas Serras do Caramulo, Buçaco, Estrela, Leomil e Montemuro. Possui um clima mediterrâneo com influência continental e marítima caracterizado por Invernos frescos, frios e húmidos com uma precipitação total de cerca de 499,4 mm e relativamente ventosos (especialmente em Janeiro) (Instituto Português de Meteorologia, [IPM], 2012). A estação da Primavera é amena, com alguma precipitação concentrada nos primeiros dois meses. Já o Verão é considerado quente e seco e o Outono húmido e fresco, com bastante precipitação concentrada nos últimos dois meses da estação (Cidade de Viseu, 2008). As temperaturas médias registadas no último ano variaram entre os 0°C de mínima (no mês de Fevereiro de 2012) e os 28°C de máxima no mês de Agosto de 2011 e em Junho de 2012 (IPM, 2012) (Gráfico 4).

A AML, com uma área total de 2.962,6 km², é constituída por 18 concelhos: Alcochete, Almada, Amadora, Barreiro, Cascais, Lisboa, Loures, Mafra, Moita, Montijo, Odivelas,

Oeiras, Palmela, Seixal, Sesimbra, Setúbal, Sintra e Vila Franca de Xira e um total de 207 freguesias (CENSOS, 2011).

Nos seus 18 concelhos, que constituem 3,3% do território nacional, residem quase 3 milhões de habitantes, cerca de ¼ da população portuguesa, registando assim a maior concentração populacional e económica de Portugal, No concelho de Lisboa residem 547 631 habitantes (AML, 2007; CENSOS 2011).

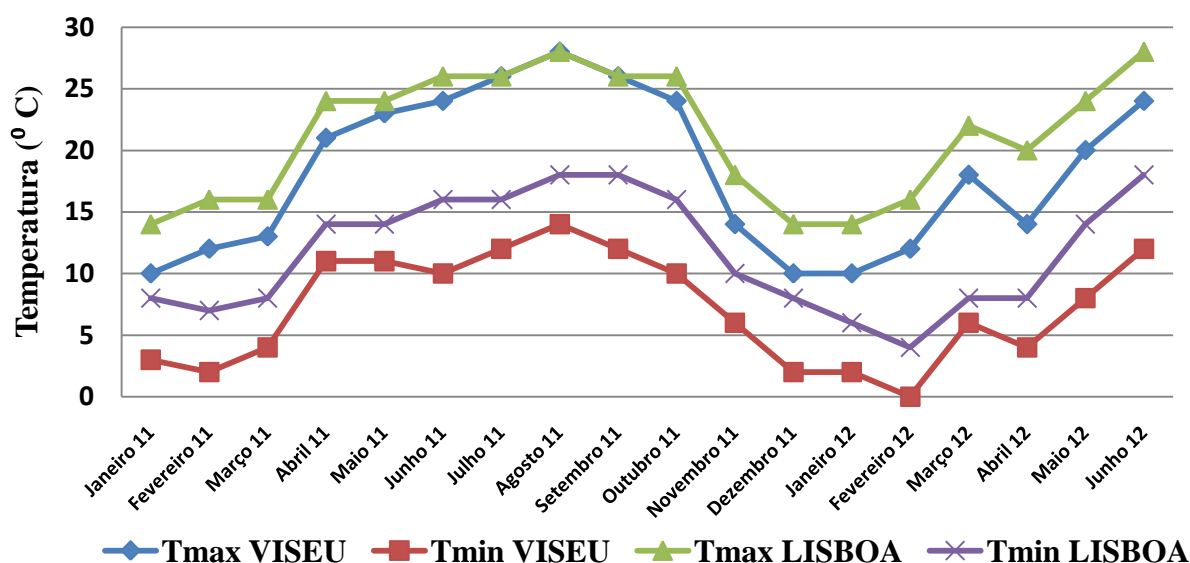
Com uma costa atlântica com cerca de 150 km e uma frente ribeirinha de cerca de 200 km, a AML apresenta uma grande variedade morfológica e abundante riqueza natural (AML, 2007). É constituída por duas penínsulas, a de Lisboa e a de Setúbal, separadas pelo estuário do rio Tejo, que desagua na enseada de Lisboa (Pereira, 2003) É, contudo uma região seca que os pequenos relevos apenas esbatem. A maior parte da sua área está contida na Região Pluviométrica do Sul, com precipitação inferior a 800 mm, repartidas por menos de 90 dias durante o ano (Pereira, 2003).

A cidade de Lisboa constitui-se como uma ilha de calor, que é mais frequente de noite, no Verão, podendo atingir mais 2°C no interior da Baixa da cidade. No Inverno também se verifica um aumento de temperatura, mas este é muito variável e dependente da dinâmica atmosférica geral e da topografia da cidade (Pereira, 2003). No último ano, na cidade de Lisboa, registaram-se médias de temperaturas mínimas de 4°C e 28°C de temperaturas máximas (IPM,2012) (Gráfico 4).

Sintra é uma vila portuguesa da AML, constituída por 20 freguesias. É a sede do concelho com 317km² de área geográfica e com 377 837 habitantes (CENSOS, 2011). As condições climáticas que se fazem sentir na região sintrense estão associadas a dois factores: (1) localização do concelho relativamente ao Oceano Atlântico e (2) a barreira de condensação que a Serra de Sintra constitui. Deste modo, à medida que nos aproximamos da costa os níveis de radiação diminuem. A insolação apresenta o mesmo tipo de variação mas, na zona da Serra registam-se valores tão baixos que se devem à nebulosidade aí existente. Quanto à temperatura, ela apresenta os seus valores mais baixos na zona da Serra e no extremo Nordeste do concelho; no primeiro caso devido à altitude e no segundo às condições de relativa continentalidade. Finalmente, quanto à precipitação, verificam-se duas situações bem diferenciadas: uma mais seca, junto ao litoral, e outra mais húmida, que abrange a zona de influência directa da Serra (onde a precipitação atinge o seu máximo) e toda a área oriental do concelho (Câmara Municipal de Sintra, 2011).

Gráfico 4. Média das temperaturas máximas e mínimas registadas nas cidades de Viseu e Lisboa desde Janeiro de 2011 a Junho de 2012

(Adaptado de Instituto Português de Meteorologia, 2012)



3. Material e Métodos

3.1. Caracterização da Amostra

A população em estudo foi constituída por 80 gatos (*Felis catus*) subdividida em 4 grupos de 20 animais, dois grupos de gatos domésticos e outros dois de gatos errantes. Ao distrito de Viseu pertencem dois grupos, um de gatos domésticos e um de gatos errantes e ao distrito de Lisboa os outros dois.

No distrito de Viseu todas as amostras foram colhidas na cidade de Viseu, em dois hospitais veterinários (SOS Animal Viseu e Tutti Natura), ambos localizados no centro da cidade (Grupo Domésticos Viseu – GDV) e no Cantinho dos Animais Abandonados de Viseu (CAAV) que se situa em Rio de Loba, Junto ao Centro Hípico na periferia da mesma (Grupo Errantes Viseu - GEV). Na AML, a colheitas das amostras foi realizada no IVP (Grupo Domésticos Lisboa – GDL) que se localiza na cidade de Lisboa, na rua Castilho. Na Clínica Veterinária VetLírios em sinergia com a Associação Animais de Rua, localizada em Sintra, na freguesia de Algueirão-Mem Martins procedeu-se às colheitas por intermédio de uma campanha de esterilização/castração de gatos errantes das zonas de Lisboa e Sintra (Grupo Errantes Lisboa – GEL) (Tabela 7).

Tabela 7. Representação gráfica da proveniência das amostras dos gatos.

Gatos Domésticos			Gatos Errantes	
Viseu	GDV	Hospital Veterinário SOS Animal de Viseu	GEV	Cantinho dos Animais Abandonados de Viseu
		Hospital Veterinário Tutti- Natura		
AML	GDL	Instituto Veterinário do Parque	GEL	Associação Animais de Rua em sinergia com a Clínica Veterinária VetLírios

Legenda: GDV: Grupo Domésticos de Viseu; GEV: Grupo Errantes de Viseu; GDL: Grupo Domésticos de Lisboa; GEL: Grupo Errantes de Lisboa; AML: Área Metropolitana de Lisboa

Nos dois grupos de animais domésticos, de modo a caracterizar melhor a população destes animais, foram realizados inquéritos aos seus proprietários (Anexo I). Foram registados os seguintes dados: sexo, idade, raça, tipo de pelagem, proveniência do gato, habitat (exterior, interior ou misto), contacto com outros animais, presença de idosos ou crianças no agregado familiar, medidas de prevenção aplicadas contra a picada do insecto vector, presença de doenças concomitantes e de sinais clínicos compatíveis com Leishmaniose felina.

Nos dois grupos de animais errantes os dados registados foram: sexo, idade (jovem, adulto e idoso) e presença de doenças concomitantes como FIV e FeLV (apenas no Cantinho dos Animais Abandonados de Viseu).

3.2. Colheita e conservação do material biológico

As amostras de sangue dos gatos foram obtidas aquando de análises de rotina (manutenção de doença renal crónica, cirurgias, etc) ou em casos de suspeita de doença. As colheitas foram maioritariamente efectuadas a partir da veia jugular, e ocasionalmente a partir da veia cefálica.

Por dificuldade na contenção de alguns animais, houve necessidade de recorrer a sedação ligeira de acordo com o seguinte protocolo: 0,2 ml de Ketamina (15 mg/Kg) + 0,3 ml de Cloridrato de Medetomidina (1 mg/ml) por via intramuscular para indução de sedação e após o procedimento de colheita foi administrado 0,2 ml Cloridrato de Atipamezol (5mg/ml) via intramuscular, para reverter a mesma.

Inicialmente foi realizada tricotomia do local a puncionar, posteriormente procedeu-se à assépsia do mesmo com álcool etílico a 70% e foram colhidos cerca de 2 ml de sangue por animal. Um mililitro foi utilizado para a técnica de qPCR para pesquisa de ADN de *Leishmania* e como tal foi transferido para um tubo com EDTA e de seguida congelado a -20°C. O restante sangue foi colocado num tubo seco para posterior obtenção de soro para a detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* por IFI e anticorpos contra o vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e ainda para detecção de antígeno do vírus da Leucemia Felina (FeLV) ambos pela técnica de ELISA, e por fim congelado a -20°C.

3.3. Métodos de diagnóstico e respectivos protocolos

Para pesquisar a infecção por *L. infantum* foram utilizadas duas técnicas de diagnóstico, isto é testes serológicos para pesquisa de anticorpos através do método de imunofluorescência indirecta (IFI), e técnicas de biologia molecular, PCR em tempo real (qPCR) para detecção de ADN do parasita. Para o método de IFI foi utilizado como limiar de positividade 1:40 e de 1:80 nas amostras positivas.

Foram ainda realizados, apenas nas amostras positivas a qualquer uma das técnicas (IFI e qPCR) a detecção de anticorpos contra FIV e antígeno de FeLV.

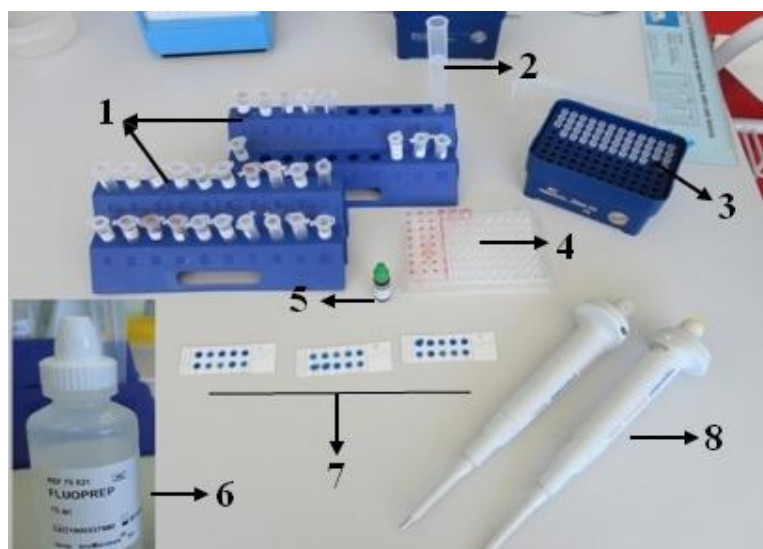
3.3.1. Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania infantum* pela técnica de Imunofluorescência Indirecta (IFI)

Foi usado como controlo positivo o soro de um gato gentilmente cedido pelo Mestre Jacinto Gomes do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária de Lisboa, previamente analisado com títulos significativos de anticorpos anti-*Leishmania*. Como controlo negativo foi utilizado tampão fosfato-salino (PBS). Para a técnica da IFI, utilizou-se o Kit *Leishmania*-Spot IF (Laboratório bioMérieux, França), utilizado para os cães, adaptando as indicações do fabricante ao objectivo do trabalho (Figura 16):

1. Retirar as lâminas com antígeno do frigorífico e colocá-las à temperatura ambiente durante 15 minutos;
2. Preparar o PBS (BioMérieux, França, Ref. 75 511) diluindo-o em 1 litro de água destilada;
3. Preparar o PBS-Tween 80, através da junção de 1 mililitro de Tween 80 (Merck, Alemanha, Ref. 822 187) a 1 litro do preparado anterior, agitar muito bem a preparação de PBS;

4. Numa microplaca, depositar 195 μ L de PBS no número de poços correspondente ao número de soros que se pretende testar;
5. Depositar 50 μ L de PBS no poço da coluna seguinte (coluna 2);
6. Depositar 5 μ L de cada soro no respectivo poço da coluna 1 com PBS e pipetar com o fim de os misturar, obtendo a diluição 1:40;
7. Proceder de igual modo para os restantes soros a testar nos poços seguintes da coluna 1;
8. Com uma micropipeta contendo o volume de 50 μ L:
 - a. Fazer a diluição na coluna 1;
 - b. Passar 50 μ L da coluna 1 para a coluna 2, obtendo a diluição 1:80 nos poços da coluna 2;
9. Com a micropipeta retirar 10 μ L de cada poço e colocar no respectivo poço da lâmina contendo o antigénio; no último poço de cada lâmina colocar 10 μ L de controlo positivo (soro de gato positivo) e seleccionar outro poço para colocar 10 μ L de controlo negativo (10 μ L de PBS).
10. Incubar durante 30 minutos a 37 °C, em câmara húmida.
11. Lavar as lâminas da seguinte forma:
 - a. 1.^a lavagem: rápida com PBS/Tween 80;
 - b. 2.^a lavagem: 5 minutos mergulhadas num recipiente contendo PBS/Tween 80;
 - c. 3.^a lavagem: 5 minutos mergulhadas noutro recipiente contendo PBS/Tween 80;
 - d. Lavar as lâminas com água destilada;
 - e. Deixar secar bem as lâminas ao ar.
12. Depositar 10 μ L do conjugado MegaScreen FLUO VET (MegaCor Diagnostik GmbH; anticorpos anti-IgG total de gato) em cada poço, incluindo no dos controlos.
13. Incubar durante 30 minutos a 37 °C em câmara húmida;
14. Lavagem igual ao passo 11.
15. Depois de secar muito bem as lâminas fazer a montagem definitiva colocando uma gota de glicerina tamponada (1:10) Fluoprep (BioMérieux, França, Ref. 75 521) em cada poço e cobrir com uma lamela de 50x24 mm.
16. Efectuar de imediato a leitura em microscópio de fluorescência (Olympus DP10, Modelo BX50F), no comprimento de onda de 425 nm.

Figura 16. Material utilizado para a realização da técnica de IFI.



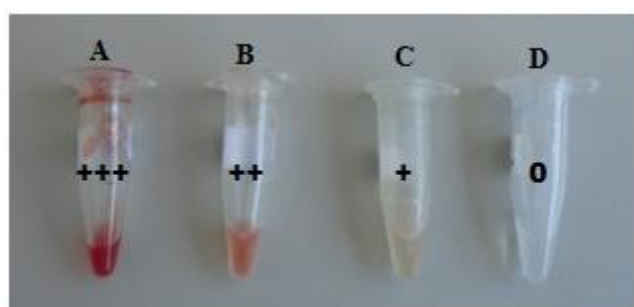
Legenda:

- 1 – Amostras;
- 2 – Tubo com PBS;
- 3 – Pontas para micropipetas;
- 4 – Microplaca;
- 5 - Conjugado MegaScreen FLUO VET;
- 6 – Fluoprep;
- 7 – Lâminas com antígeno após colocação do conjugado;
- 8 – Micropipetas.

3.3.1.1. Avaliação da hemólise e possível influência na técnica IFI

Neste estudo foi avaliado o grau de hemólise do soro das amostras com o objetivo de verificar se esta condição afecta os resultados obtidos pela técnica de IFI (Figura 17). Assim, 0 equivale a um soro sem hemólise, + a um soro ligeiramente hemolisado, ++ a um soro hemolisado e +++ a um soro fortemente hemolisado.

Figura 17. Caracterização macroscópica do estado de hemólise dos soros.



Legenda:

- A +++: Fortemente Hemolisado
- B ++: Hemolisado
- C +: Ligeiramente Hemolisado
- D 0 : Sem Hemólise

3.3.2. Detecção de ADN de *Leishmania infantum* através da técnica molecular de PCR em tempo real (qPCR)

No que diz respeito à técnica de PCR em tempo real, todas as amostras foram processadas no período compreendido entre 23 a 27 de Julho de 2012 sob orientação da Professora Doutora Ana Duarte no Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV),

Universidade Técnica de Lisboa (UTL). Do tubo de EDTA foram retirados 200 µL de sangue total dos quais foi feita extracção de ADN para pesquisa de *Leishmania* utilizando o DNeasy Blood & Tissue Kit® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as células sanguíneas foram lisadas com um tampão de lise celular (*buffer AL*) na presença de uma enzima (proteínase K) com a finalidade de promover a digestão proteica. Após a incubação de 15 minutos a 56°C, adicionou-se etanol a 100% para a precipitação de ADN. O lisado foi aplicado numa coluna de sílica com alta afinidade para ácidos nucleicos desidratados. Após centrifugação durante 1 minuto a 16 000 xg a coluna foi lavada com dois tampões de lavagem com alta concentração alcoólica (*buffer AW₁* e *buffer AW₂*) através de um passo de centrifugação nas condições acima referidas e eliminação do volume aplicado. A eluição do ADN fixo na coluna foi realizada com um tampão aquoso (*buffer AE*), nas mesmas condições de centrifugação. Os 200 µL de sangue utilizados para extracção de ADN total foram eluídos no mesmo volume de tampão de eluição (200 µL).

Posteriormente à extracção, procedeu-se à quantificação de ADN das amostras no aparelho Nanodrop 2000c Spectrophotometer® (Thermo Fisher Scientific), e todas as amostras foram conservadas à temperatura de -80°C até utilização.

O ADN após a sua extracção foi descongelado em gelo e mantido refrigerado durante todo o procedimento.

A técnica de PCR em tempo real permite a quantificação do produto de PCR e monitorização em tempo real da reacção de amplificação.

Para iniciar a reacção, é utilizado um par de *primers* ou iniciadores, que são oligonucleótidos com uma sequência de nucleótidos complementar às regiões flanqueadoras do fragmento a amplificar. Cada primer (*forward e reverse*) liga-se a cada uma das cadeias de ADN, permitindo a ligação da ADN polimerase termoestável dando início à síntese das cadeias de ADN-alvo.

As reacções de qPCR foram realizadas num termociclador Real-time 7300 - Applied Biosystems

Neste trabalho recorreu-se à tecnologia TaqMan® da Applied Biosystems, por ser mais específica uma vez que a emissão de fluorescência resulta exclusivamente da hidrólise desta sonda. Esta é um oligonucleótido marcado com um fluoróforo (*reporter*) na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3' que absorve o sinal fluorescente gerado pelo fluoróforo enquanto não se verifica a hidrólise da sonda após ligação à região correspondente do ADN. O protocolo térmico de amplificação garante a ligação da sonda fluorescente para a sequência alvo antes da ligação dos *primers* e do início da síntese pela Taq polimerase. Durante este

processo, a actividade de exonuclease 5'-3' da Taq polimerase digere a sonda, induzindo o consequente afastamento entre o *reporter* e o *quencher*, levando à emissão de fluorescência. A intensidade do sinal acumulada no final de cada ciclo é proporcional à quantidade do produto final amplificado (Mortarino, Franceschi, Mancianti, Bazzocchi, Genchi & Bandi, 2004). A amplificação é seguida visualmente em gráficos (fluorescência *versus* números de ciclos) permitindo monitorizar, em tempo real, a cinética da reacção de amplificação.

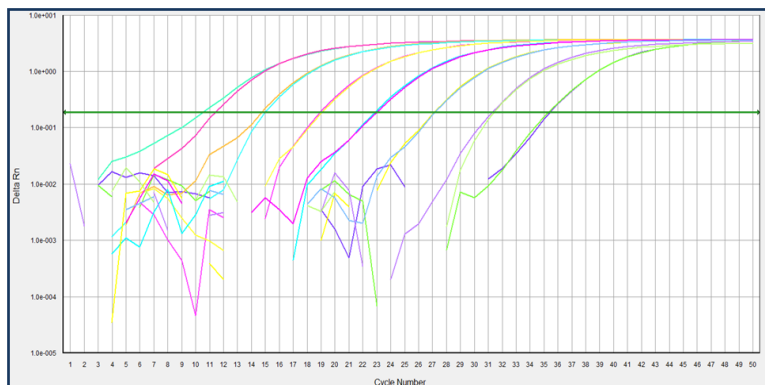
A reacção foi realizada no volume final de 20 µl, com o tampão de reacção TaqMan® Gene Expression Master Mix™ (Applied Biosystems), 0,9 µM de cada *primer*, 0,25 µM de sonda TaqMan® e a 50ng de ADN de cada amostra. O controlo positivo utilizado foi um plasmídeo recombinante pGEM T-easy (Promega, Portugal) (Laboratório de Virologia da FMV-UTL) que incluía a região a amplificar sendo diluído serialmente na base 10 (10^{-1} - 10^{-8}) de forma a gerar uma curva padrão constituída por oito pontos. Como controlo negativo recorreu-se ao uso de água Milli-Q estéril.

O valor Ct (*threshold cycle*) expressa o ciclo a partir do qual a quantidade basal de fluorescência sofre um aumento exponencial (Kubista *et al.*, 2006).

A quantificação do produto é efectuada com base em uma curva padrão baseada na diluição em série de um padrão, que pode ser um produto de PCR purificado ou um plasmídeo purificado que contém a sequência-alvo (Gráfico 5). Os valores Ct dos padrões diluídos, após leitura pelo aparelho, são representados graficamente em função do logaritmo das concentrações das amostras, do número de cópias do molde ou do factor de diluição (Kubista *et al.*, 2006) (Tabela 8).

Neste trabalho, foi utilizado o número de cópias do molde, um plasmídeo recombinante, para se construir a curva padrão.

O ensaio só foi validado quando se obteve amplificação dos controlos positivos (*standard*) e quando nos controlos negativos não se observou amplificação.

Gráfico 5. PCR em tempo real com as curvas *standard* das diluições seriadas e os seus respectivos valores Ct**Tabela 8. Diluições seriadas do *standard* e os respectivos valores Ct.**

Diluições seriadas (nº de moléculas/ μ L)	Valor Ct
$2,6 \times 10^{10}$	7
$2,6 \times 10^9$	11
$2,6 \times 10^8$	15
$2,6 \times 10^7$	19
$2,6 \times 10^6$	23
$2,6 \times 10^5$	27
$2,6 \times 10^4$	31
$2,6 \times 10^3$	35
$2,6 \times 10^2$	37

A detecção de ácidos nucleicos de *Leishmania* foi efectuada no Laboratório de Virologia da FMV-UTL e o par de *primers* específicos e a sonda TaqMan utilizadas para o diagnóstico molecular de Leishmaniose, foram calculados através do programa Primer Designing Tool do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

As condições utilizadas para a amplificação foram 10 min a 95°C para activação da enzima ADN polimerase, seguida de 50 ciclos: 15 segundos a 90°C para desnaturação, 1 minuto a 60°C para ligação dos “*primers*” (annealing) e para o processo de extensão (Tabela 9).

Tabela 9. Representação das diversas fases de amplificação de ácidos nucleicos pela técnica de PCR em tempo real.

	Activação da ADN polimerase		Por ciclo			
			Desnaturação		Annealing e Extensão	
<i>Leishmania</i>	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
	95	10	90	15	60	1

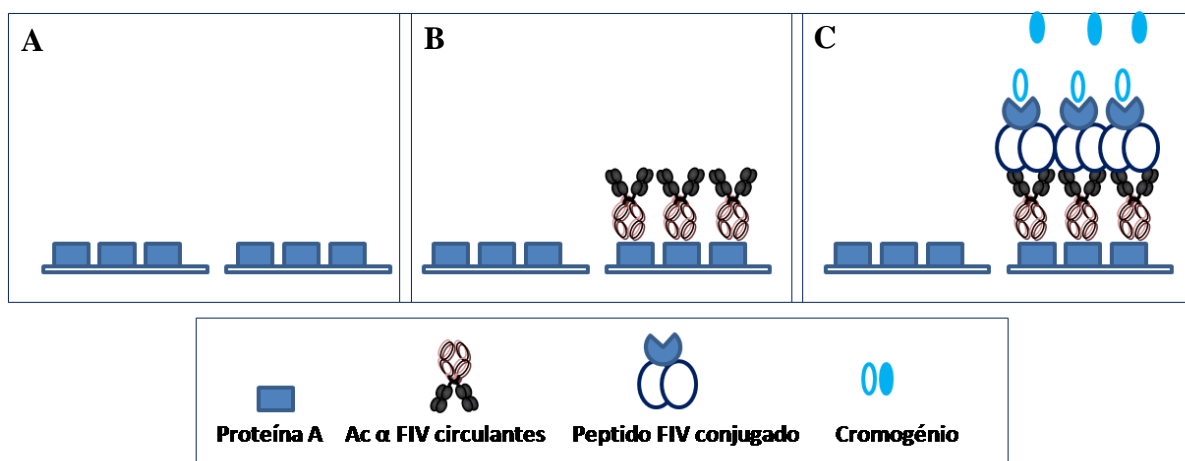
Por fim, depois de amplificados, todos os produtos de PCR com amplificação positiva devido à observação da curva de amplificação, foram corridos por electroforese em gel de agarose 2,5%, visualizados no Image Master® VDS (Pharmacia Biotech) e fotografados através do software Liscap Image Capture, versão 1.0 (Pharmacia Biotech). Os fragmentos de *Leishmania* amplificados foram enviados para sequenciação no laboratório StabVida (Portugal).

3.3.3. Detecção de anticorpos contra o Vírus da Imunodeficiência Felina

O diagnóstico laboratorial de FIV foi efectuado com o teste comercial ViraCHEK®/FIV (Synbiotics Corporation, Lote nº 11 PSFIVM 21), baseado na técnica de ELISA, para detectar a presença de anticorpos anti- p24 (anti-FIV) no plasma dos animais. Os poços da placa apresentam-se revestidos com proteína A (Pa), uma proteína com afinidade para a região Fc dos anticorpos quando estes se encontram presentes no plasma do gato.

A adição da Pa conjugada a uma enzima liga-se ao complexo Ac/Ag e promove o desenvolvimento de uma cor azul, após adição do substrato enzimático e do cromogénio. Na ausência dos Ac específicos não é observada o desenvolvimento de cor, ficando o poço incolor (Figura 18 e 20). Este teste foi realizado apenas aos animais com resultados positivos para a infecção por *Leishmania* nas técnicas de IFI e qPCR. A técnica foi efectuada de acordo com as instruções do fabricante e os resultados foram analisados e registados de imediato.

Figura 18. Resumo ilustrativo da técnica de ELISA do teste ViraCHEK®/FIV
(Cedido gentilmente pela Professora Doutora Ana Duarte)



Legenda: A- Suporte de plástico forrado com Proteína A; B- Adição do soro do gato com Ac Anti-Fiv, formação dos complexos Ac/Ag; C- Adição do conjugado ligado um péptido que ao se ligar ao complexo Ac/Ag emite cor.

3.3.4. Detecção de antígeno do Vírus da Leucemia Felina

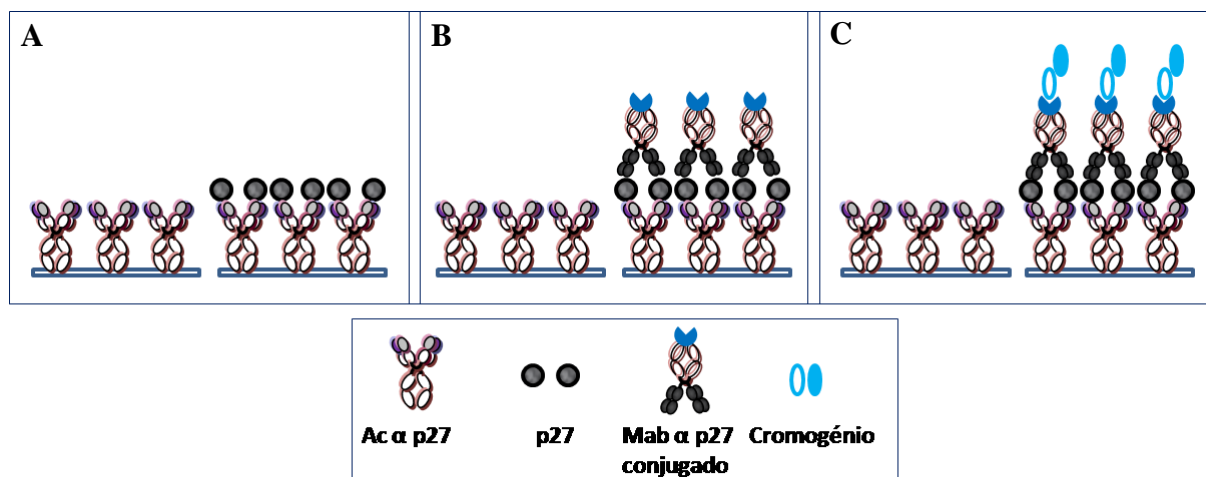
O diagnóstico de FeLV foi realizado com o teste ViraCHEK®/FeLV (Synbiotic Corporation), baseado na técnica ELISA para detecção da presença da proteína da cápside viral p27 presente em circulação nos gatos com FeLV.

A presença de antígeno de FeLV ligado a um anticorpo monoclonal conjugado (complexo Ac/Ag) com uma peroxidase promove o desenvolvimento de uma cor azul, que na sua ausência não é observada, ficando o poço incolor (Figura 19 e 20).

Este teste foi realizado apenas aos animais com resultados positivos em qualquer uma das técnicas para a detecção da infecção por *L. infantum*.

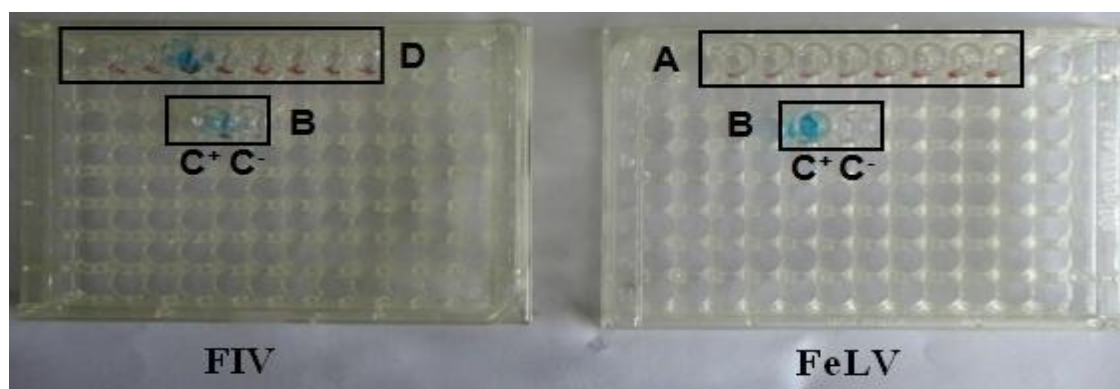
A técnica foi executada de acordo com as instruções do fabricante e os resultados foram analisados e registados de imediato.

Figura 19. Resumo ilustrativo da técnica de ELISA do teste ViraCHEK®/FeLV
(Cedido gentilmente pela Professora Doutora Ana Duarte)



Legenda: A- Suporte de plástico forrado com anticorpos anti-p27; B- Adição do soro do gato com Ag; formação dos complexos Ac/Ag; adição de anticorpos monoclonais conjugados com uma peroxidase; C- após ligação ao complexo Ac/Ag emite cor.

Figura 20. Teste ViraCHEK®/FIV e ViraCHEK®/FeLV com um resultado positivo a FIV.



Legenda: A – Conjunto de 8 amostras negativas; B – Conjunto de controlos (Negativo (C-) e Positivo (C+)); D – Conjuntos de 8 amostras com um poço positivo para FIV (azul).

3.4. Métodos Estatísticos

Para a análise estatística dos resultados, recorreu-se a dois programas - o Excel 2007 do Microsoft Office® (Microsoft Corporation, EUA) e o SPSS® 20.0 (*Statistical Package for Social Science*®, IBM®, EUA).

Foram utilizados métodos de estatística descritiva e como medidas estatísticas usou-se frequências absolutas e percentuais (relativas) para a apresentação das variáveis estudadas em gráficos, tabelas e medidas numéricas de síntese. Para a realização das associações estatísticas, foi utilizado o Teste Qui-Quadrado (χ^2), que foi escolhido por a amostra em causa ter uma dimensão pequena ($n=80$). Para as associações entre variáveis o nível de significância assumido foi $p < 0,05$, para um intervalo de confiança (IC) de 95%.

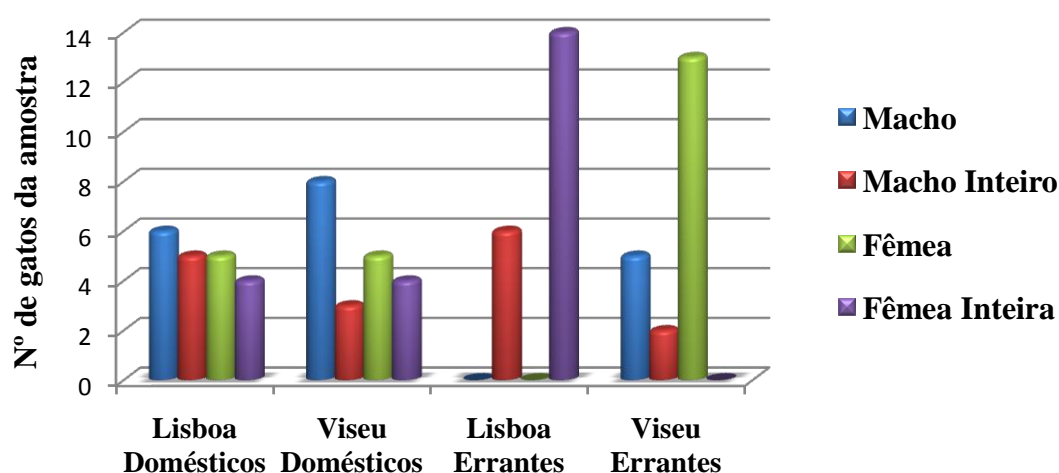
O Teste de *Qui-Quadrado* (χ^2) é utilizado para o estudo de relações entre variáveis nominais, aplicando-se a uma amostra em que a variável nominal tem duas ou mais categorias, comparando as frequências observadas com as que se esperam obter no universo para se inferir sobre a relação existente entre as variáveis. Se as diferenças entre os valores observados e esperados não se considerarem significativamente diferentes, o valor do teste pertence à região de aceitação e as variáveis são independentes, caso contrário, rejeita-se a hipótese de independência, ou seja, os valores do teste pertencem à região crítica (Pestana & Gageiro, 2005).

4. Resultados

4.1. Caracterização dos animais da amostra

4.1.1. Sexo dos animais da amostra

Do total da amostra, 45 (56%) gatos pertenciam ao sexo feminino e 35 (44%) ao sexo masculino. Do sexo feminino 28,62% (23/45) eram fêmeas ovariohisterectomizadas e 27,38% (22/45) eram fêmeas inteiras. Relativamente ao sexo masculino 23,89% (19/35) eram machos orquiectomizados e 20,11% (16/35) eram machos inteiros (Gráfico 6). De referir que o grupo GEL era constituído apenas por fêmeas (14/20) e machos inteiros (6/20), que posteriormente foram ovariohisterectomizadas/orquiectomizados.

Gráfico 6. Distribuição dos animais da amostra por grupo e por sexo.

4.1.2. Idade dos animais da amostra

A idade mínima apresentada no GDL foi de 1 ano e a máxima de 22 anos, enquanto que no GDV a idade mínima registada foi de 2 anos e a máxima de 14 anos (Tabela 10). A média das idades dos felinos visienses ronda os 6 anos e 6 meses, enquanto que os felinos lisboetas apresentaram uma média de idade de 9 anos e 3 meses.

Nos grupos de animais errantes as suas idades aproximadas foram registadas como jovens, adultos ou idosos. Este parâmetro foi avaliado com base na dentição dos animais e na conformação corporal dos mesmos. Deste modo, no GEV a maioria dos gatos detinham características de animais adultos e os 20 felinos do GEL possuíam características de gatos jovens, mas todos com mais de 1 ano de idade.

Tabela 10. Distribuição da amostra de gatos domésticos de Viseu e Lisboa por idades.

Idade (anos)	GDL		GDV	
	Frequência Absoluta (20)	Frequência Relativa (%)	Frequência Absoluta (20)	Frequência Relativa (%)
< 1	0	0	0	0
1-3	4	20	6	30
4-6	3	15	5	25
7-9	2	10	4	20
10-12	6	30	4	20
13-15	3	15	1	5
≥ 16	2	10	0	0

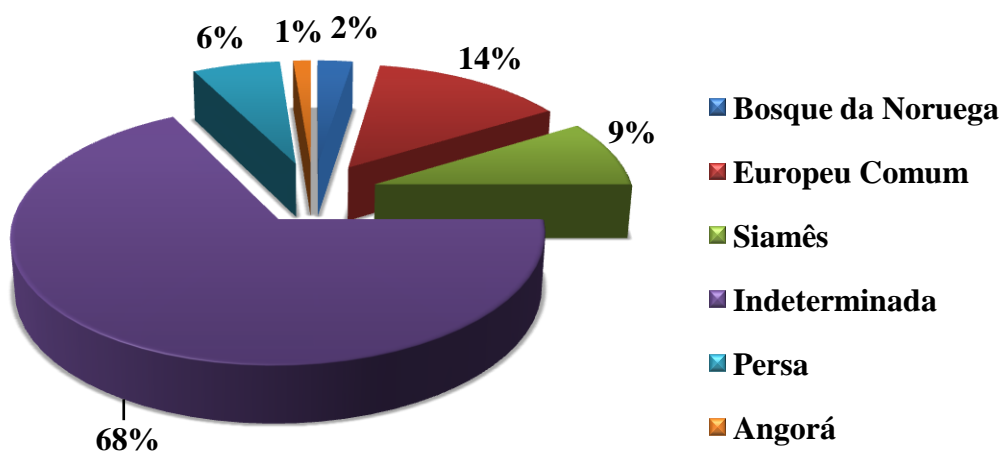
Legenda: GDL: Gatos domésticos de Lisboa; GDV: Gatos domésticos de Viseu

4.1.3. Raça e tipo de pelagem dos animais da amostra

Nos dois grupos de animais errantes não foi possível apurar a raça dos mesmos, pelo que foram caracterizados como tendo raça indeterminada.

No total de 80 gatos, 68% (54/80) não possuíam raça determinada, apenas 26 animais apresentava raça pura. Destes 14% (11/80) eram Europeu Comum, 9% (7/80) Siamês, 6% (5/80) Persa, 2% (2/80) Bosque da Noruega e 1% (1/80) Angorá (Gráfico 7).

Gráfico 7. Distribuição dos gatos da amostra por raça (n=80).



No que diz respeito ao tipo de pelagem este parâmetro foi apenas avaliado nos grupos de animais domésticos. Gatos de raça Persa, Angorá e Bosques da Noruega possuem pêlo comprido, no entanto alguns animais Europeu Comum e de raça indeterminada também. Neste contexto, todos estes gatos de pêlo comprido, no seu conjunto constituem 30% (12/40) da amostra de gatos domésticos.

4.1.4. Proveniência dos animais da amostra

Embora alguns já tenham nascido no gatil, todos os gatos errantes de Viseu foram recolhidos da rua ou abandonados no CAAV. Dos gatos errantes de Lisboa os 20 animais foram recolhidos da rua e sujeitos à campanha CER (captura/esterilização/retorno à origem).

Nos dois grupos de felinos domésticos existe uma melhor noção sobre a proveniência dos animais. Em ambos os grupos a maioria dos animais foram resgatados da rua há pelo menos 1 ano, com frequências relativas de 50% (10/20) para o GDL e 35% (7/20) para o GDV (Tabela 11).

Uma percentagem de 65% (13/20 para os dois grupos de animais domésticos de Viseu e Lisboa) estava com os proprietários desde gatinho (menos de 3 meses de idade), enquanto que 30% (5/20 do GDL e 7/20 do GDV) só a partir dos 5-12 meses de idade e 5% (2/20 apenas do GDL), somente desde os 2-3 anos, idade aproximada com a qual foi recolhido da rua.

Tabela 11. Proveniência dos animais domésticos de Viseu e Lisboa.

	GDL		GDV	
	Frequência Absoluta (20)	Frequência Relativa (%)	Frequência Absoluta (20)	Frequência Relativa (%)
Criador	1	5	3	15
Loja	0	0	2	10
Gatil	2	10	2	10
Oferecido por particular	4	20	6	30
Nascido em casa do proprietário	3	15	0	0
Resgatado da rua	10	50	7	35

Legenda: GDL: Grupo Domésticos Lisboa; GDV: Grupo Domésticos Viseu

4.1.5. Caracterização do habitat dos animais da amostra

Neste estudo foram definidos três tipos de habitat: permanência exclusivamente no exterior, permanência no interior da habitação com acesso ao exterior (incluindo varanda e/ou quintal) também designado como habitat misto, e permanência exclusivamente no interior de uma residência. Como seria de esperar o habitat de todos os gatos errantes é exclusivamente exterior, no entanto no CAAV, existe uma zona abrigada constituída por 2 casas. A área total do gatil ronda os 300m² e as casas têm aproximadamente 50m² e 4m². O CAAV é um abrigo que alberga cerca de 60 gatos e 150 cães. Os animais estão separados por espécies e os canídeos estão divididos em grupos de 10 cães por abrigo. Não houve registo de casos de Leishmaniose canina nesta instituição.

Dos 2 grupos de gatos domésticos, em Lisboa 70% (14/20) dos animais permaneciam exclusivamente no interior e os outros 30% (6/20) tinham um habitat misto. Estes valores são ligeiramente diferentes quando se trata dos felinos da cidade de Viseu, onde 55% (11/20) usufruíam de um habitat interior e 45% (9/20) de um habitat misto (Tabela 12).

A maioria dos gatos domésticos com habitat misto tem acesso livre ao exterior sempre que quiser, mas dorme dentro de casa.

Tabela 12. Representação das Frequências Absolutas e Relativas dos tipos de habitat dos felinos domésticos de Lisboa e Viseu.

	GDL		GDV	
	Frequência Absoluta (20)	Frequência Relativa (%)	Frequência Absoluta (20)	Frequência Relativa (%)
Interior	14	70	11	55
Misto	6	30	9	45
Exterior	0	0	0	0

Legenda: GDL: Gatos domésticos de Lisboa; GDV: Gatos domésticos de Viseu

4.2. Resultados obtidos nos inquéritos realizados aos proprietários dos felinos domésticos de Lisboa e Viseu

A informação relativa às características do animal, habitat, acesso ao exterior, presença de crianças e idosos no agregado familiar em que o animal se encontra inserido, partilha do habitat com outros animais, profilaxia realizada contra ectoparasitas, a sua frequência e produto utilizado, presença de doenças concomitantes e respectiva terapêutica e ainda existência de sinais compatíveis com possível Leishmaniose encontra-se compilada na Tabela 13.

Tabela 13. Frequências absolutas e relativas dos resultados do inquérito efectuado aos proprietários dos gatos domésticos de Lisboa e Viseu.

Perguntas dos inquéritos aos proprietários dos animais	GDL		GDV	
	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Agregado familiar com crianças e idosos	9	45	10	50
Co-habita com outros animais	13	65	12	60
Cão	7	54	5	42
Gato	10	77	8	67
Outros	0	0	2	17
Profilaxia contra ectoparasitas	11	55	11	55
Testados contra FIV/FelV	1	5	4	20
Doenças Concomitantes	12	60	5	25

Legenda: GDL: Gatos domésticos de Lisboa; GDV: Gatos domésticos de Viseu

Relativamente ao habitat, 45% (9/20) dos GDL e 50% (10/20) dos GDV não englobavam, no seu agregado familiar, crianças e idosos, no entanto, mais de 50% de cada amostra co-habitava com outros animais, nomeadamente cães e gatos. No GDV existem dois casos em que os gatos co-habitavam com uma tartaruga e um periquito, respectivamente.

No que concerne à deslocação dos gatos com os seus proprietários, 22,5% (2/20 do GDL e 7/20 do GDV) acompanhavam os mesmos em férias ou durante os fins-de-semana, dos quais 5% (2/40 apenas do GDV) para praia e campo, 15% (2/20 do GDL e 4/20 do GDV) só para campo e 2,5% (1/40 apenas do GDV) só para praia.

Relativamente aos parâmetros avaliados no que diz respeito à saúde dos gatos, 55% (22/40) dos GDL e dos GDV realizavam profilaxia contra ectoparasitas sendo os dois produtos comerciais mais utilizados o Imidaclopride (Advantage[®]) nos gatos de Lisboa e o Fipronil (Frontline[®]) nos de Viseu. Os donos dos animais que não efectuavam profilaxia (45%) alegaram por serem animais de apartamento não se justificava a prevenção e ainda por razões económicas.

Dos quarenta gatos domésticos analisados, 42,5% (17/40) apresentavam doenças concomitantes, sendo as mais comuns a insuficiência renal crónica e as doenças do foro endócrino em animais com idade superior a sete anos, tais como hipertiroidismo e diabetes mellitus. Mais esporadicamente e em animais com idades compreendidas entre os 2 e os 5 anos a doença mais comum apresentada foi a pancreatite. Ainda nestes animais mais jovens, há casos de politraumatismo e de urolíase. Adicionalmente, apenas 12,5% (5/40) dos animais foram testados durante a consulta para a presença de vírus imunossupressores (FIV e FeLV), tendo apenas um apresentado resultado positivo para FIV.

De todos os gatos domésticos nenhum apresentava qualquer tipo de sinal clínico compatível com Leishmaniose.

4.3. Resultados obtidos na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de IFI

Os 80 gatos do estudo foram testados pela técnica de IFI, na diluição 1:40 dos quais 15 gatos apresentaram resultados positivos (Figura 21). Os restantes apresentaram resultados negativos. Destes 15 animais positivos (prevalência verdadeira de 16,8%), prosseguiu-se a análise na diluição de 1:80, na qual todos os resultados foram negativos (Anexo II e III).

Dos 15 animais que apresentaram positividade pela técnica de IFI, 5 pertenciam, respectivamente, a cada um dos grupos de Viseu (GDV e GEV), enquanto que nos grupos de Lisboa um animal pertencia ao GEL e 4 eram do GDL (Tabela 14).

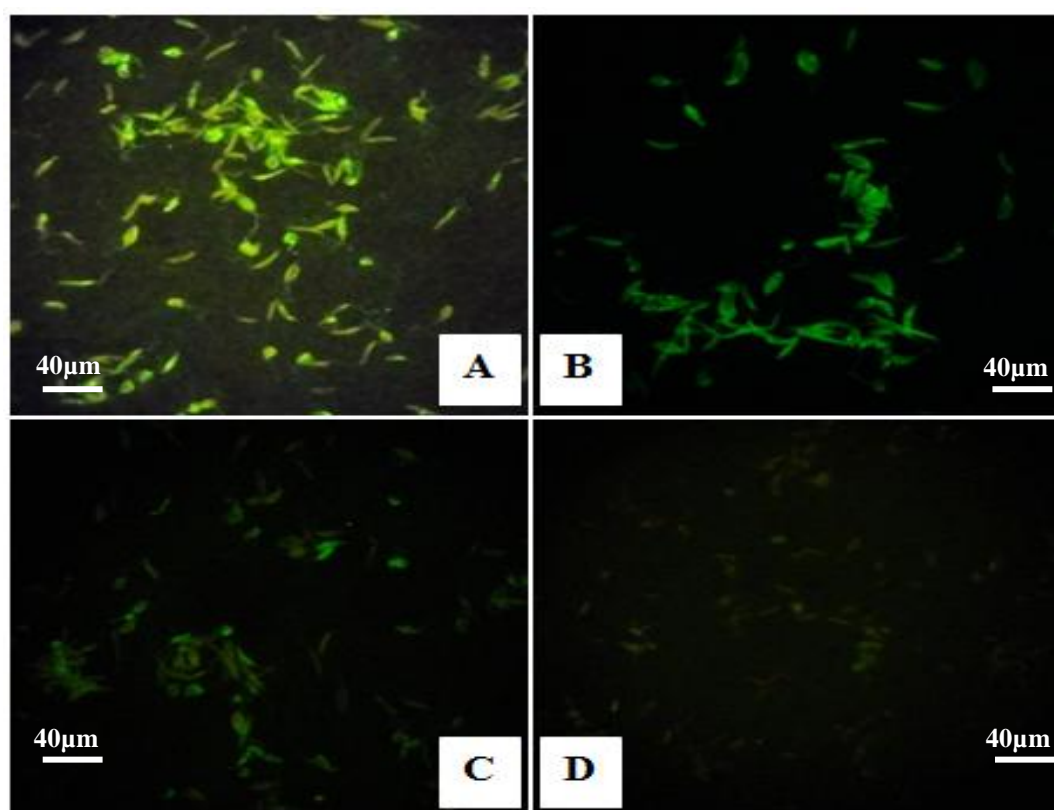
Após análise estatística dos dados, não se obteve qualquer relação entre a hemólise do soro e o respectivo resultado obtido na IFI ($p=0,611$).

Tabela 14. Seroprevalências obtidas pela técnica de IFI (diluição 1:40) nos diferentes grupos analisados (nº de indivíduos/ grupo = 20).

		GDL	GEL	GDV	GEV
IFI Diluição 1:40	Frequência Absoluta	4	1	5	5
	Prevalência Aparente (%)	20	5	25	25
	Prevalência Verdadeira (%)	18,2	1,7	23,7	23,7

Nota: Na tabela não estão representados os resultados obtidos pela técnica de IFI, na diluição 1:80, pois todos os resultados foram negativos, resultando em seroprevalências de 0%.

Figura 21. Aspecto de várias amostras pela técnica de IFI de *Leishmania*, titulação 1:40.

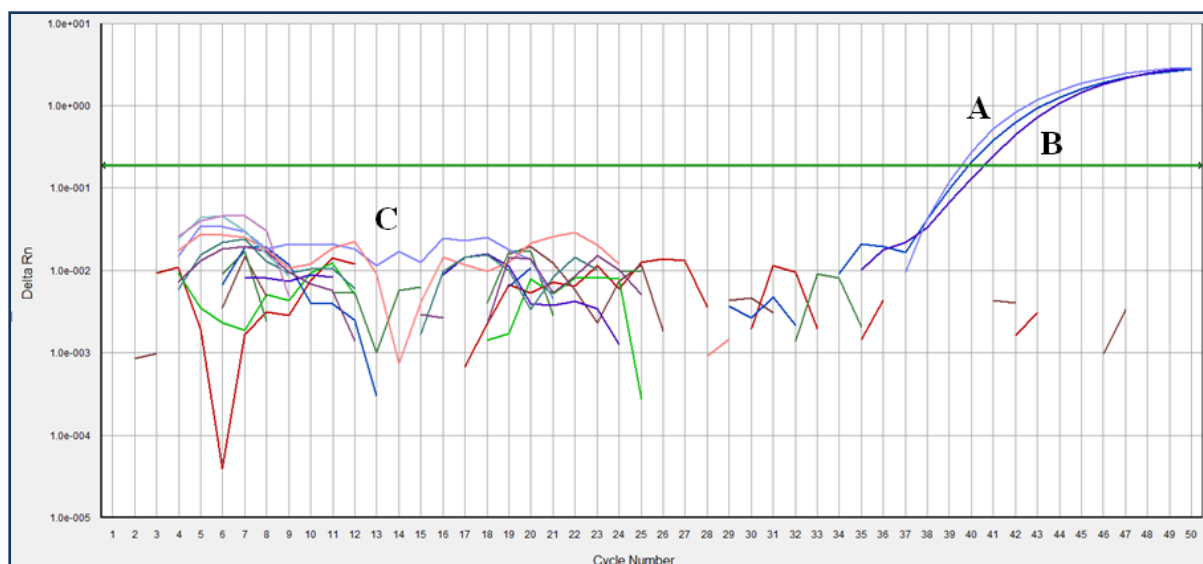


Legenda: A - Aspecto do controlo positivo para *Leishmania*, B - Aspecto de uma amostra positiva para a infecção por *Leishmania*; C - Aspecto de uma amostra com positividade fraca para a infecção por *Leishmania*; D - Aspecto de uma amostra com resultado negativo.

4.4. Resultados obtidos na pesquisa de ADN de *Leishmania* pela técnica de qPCR

Do total de 80 gatos da amostra, apenas 71 foram testados pela técnica de qPCR. Através deste método de diagnóstico foi possível detectar oito amostras positivas (11,3%), duas pertencendo a cada grupo – 10% (2/20) (Gráfico 8). Os gatos positivos obtiveram valores Ct entre 38 e 40 o que corresponde a uma detecção de aproximadamente 100 a 500 cópias de molécula alvo por amostra (Anexo II e III). Embora o sistema seja sensível, mas não será correcto extrapolar o número de moléculas com significado biológico correlacionando-as com a existência de amastigotas íntegros.

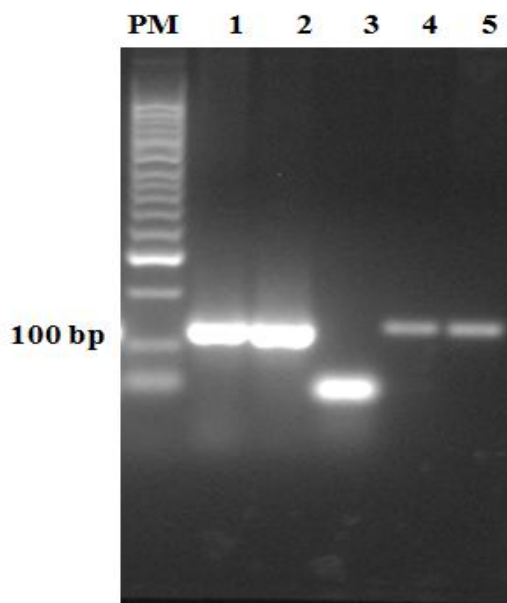
Gráfico 8. Resultados do qPCR de *Leishmania* com amplificação de duas amostras positivas (A e B), tendo A uma réplica e ausência de amplificação de quatro amostras (C).



Todas as amostras testadas por qPCR foram posteriormente submetidas a electroforese onde foi verificada a correspondência entre o peso molecular obtido e o esperado (Figura 22).

De salientar que no nosso estudo, nenhum dos gatos seropositivos a *Leishmania infantum* foi simultaneamente qPCR positivo.

Figura 22. Resultados da electroforese a que foram submetidas as amostras que obtiveram amplificação do produto.



Legenda:

PM - marcadores moleculares;
1 e 2 – controlos positivos;
3 – Dímeros de *primers*;
4 e 5 – amostras com o mesmo peso molecular dos controlos positivos;
bp – pares de bases

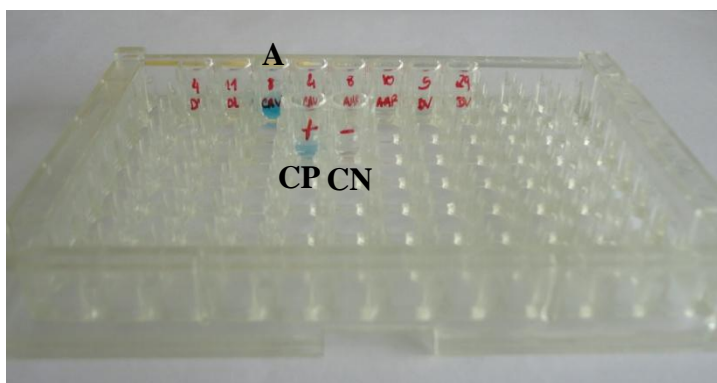
4.5. Resultados da detecção de anticorpos anti-FIV e antígeno de FeLV nas amostras positivas a *Leishmania* pelas técnicas de IFI e qPCR

No total das amostras positivas a *Leishmania* (15 positivos a IFI e 8 positivos a qPCR), apenas um gato revelou positividade a FIV e dois gatos obtiveram resultado positivo a FeLV. No caso do gato positivo a FIV pelo Teste ViraCHEK®/FIV (Figura 23 e 24) este era um animal adulto, do sexo masculino e pertencia ao GEV e não apresentava qualquer sinal que fosse compatível com a imunodeficiência felina. A sua amostra revelou-se positiva a *Leishmania* pela técnica de qPCR.

Figura 23. Gato Errante de Viseu com resultado positivo para FIV.



Figura 24. Teste ViraCHEK®/FIV com um resultado positivo (A) evidenciando o controlo positivo (CP) e o negativo (CN).



Os dois gatos positivos a FeLV e simultaneamente positivos a *Leishmania* pela técnica de IFI pertenciam ao grupo dos GDV. Eram ambos machos orquiectomizados, com idades de dois e quatro anos, de raça indeterminada e de pelagem curta. O habitat destes animais caracterizava-se por ser misto e ambos co-habitavam com um cão e um gato, respectivamente. Apenas um realizava profilaxia contra ectoparasitas (Fipronil – Frontline®) e o outro apresentava um abcesso traumático no pescoço para o qual estava a ser medicado com antibiótico, anti-inflamatório e desinfecção local.

4.6. Resultados da análise estatística efectuada

Segundo Pestana e Gageiro (2005) podem ser seleccionados os seguintes níveis de significância: $p < 0,05$ estatisticamente significativo; $p < 0,01$ estatisticamente bastante significativo; $p < 0,001$ estatisticamente muito significativo; $p \geq 0,05$ não significativo.

Em relação aos grupos estudados, estes foram divididos em grupos de Lisboa (GDL+GEL), de Viseu (GDV+GEV), de Gatos Domésticos (GDL+GDV) e de gatos Errantes (GEL+GEV). A associação destes grupos com os resultados obtidos pela técnica de IFI, de qPCR, de ViraCHEK®/FIV e ViraCHEK®/FeLV não revelou diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis, pois os valores de significância apresentados variaram entre $p > 0,152$ e $p < 0,565$ (Tabela 15). Concluindo assim, que no nosso trabalho, não existe nenhuma associação entre a infecção por *L. infantum* e os distritos estudados (Lisboa e Viseu), assim como entre gatos domésticos e errantes.

Tabela 15. Resultados da comparação entre os grupos dos animais da amostra e as técnicas de diagnóstico realizadas.

	Gatos Lisboa (n=40)	Gatos Viseu (n=40)	Análise Estatística Lisboa vs Viseu	Gatos Domésticos (n=40)	Gatos Errantes (n=40)	Análise Estatística Domésticos vs Errantes
	%	%		%	%	
IFI						
Positivo	12,5	25	$X^2 = 0,205$ $p = 0,152$	22,5	15	$X^2 = 0,738$ $p = 0,390$
Negativo	87,5	75		77,5	85	
qPCR						
Positivo	10	10		10	10	
Negativo	85	72,5	$X^2 = 3,175$ $p = 0,204$	75	82,5	$X^2 = 1,143$ $p = 0,565$
Não se realizou	5	17,5		15	7,5	
ViraCHEK®/ FIV						
Positivo	0	2,5		0	2,5	
Negativo	22,5	32,5	$X^2 = 2,166$ $p = 0,339$	32,5	22,5	$X^2 = 1885$ $p = 0,390$
Não se realizou	77,5	65		67,5	75	
ViraCHEK®/ FeLV						
Positivo	0	5		5	0	
Negativo	22,5	30	$X^2 = 2,867$ $p = 0,238$	27,5	25	$X^2 = 2,206$ $p = 0,332$
Não se realizou	77,5	65		67,5	75	

Legenda: Gatos Lisboa: GDL+GEL, Gatos Viseu: GDV+GEV; Gatos Domésticos: GDL+GDV; Gatos Errantes: GEL+GEV; n: Frequência Absoluta; %: Frequência Relativa; X^2 : Teste de Qui-Quadrado; p : índice de significância; IFI: Imunofluorescência Indirecta; qPCR: Reacção em Cadeia da Polimerase em tempo real; FIV: Vírus da Imunodeficiência Felina; FeLV: Vírus da Leucemia Felina

Através técnica de IFI a prevalência aparente obtida foi de 18,75% (IC 95= [28,7%-11,7%]). No entanto a nível estatístico como a técnica de IFI não possui valores de sensibilidade e de especificidade de 100%, este valor teve que ser adaptado à metodologia. Deste modo, a prevalência verdadeira resultante foi de 16,8% (IC 95= [27,5%-8,6%]).

Para a mesma técnica de diagnóstico, após análise estatística com a idade, sexo, raça, tipo de pelagem, proveniência dos animais, habitat, contacto com outros animais, presença de crianças e/ou idosos no agregado familiar, realização de profilaxia e presença de doenças concomitantes, apenas uma categoria (realização de profilaxia quando associada com a IFI) apresentou um resultado estatisticamente significativo.

Em todas as outras categorias os valores de significância encontram-se entre 0,263 e 0,885 (Anexo IV). A realização de profilaxia obteve um valor de significância de $p=0,009$, o que revela assim uma associação com os resultados obtidos através da técnica de IFI para detecção da infecção por *L. infantum*.

Todas as outras tentativas de associações entre o qPCR e os parâmetros citados acima não obtiveram significado estatístico ($p > 0,05$), não estando a presença de infecção por *L. infantum* associada a nenhum das variáveis estudadas (Anexo V).

Para os vírus imunossupressores, FIV e FeLV, os parâmetros avaliados foram a idade, a raça e o sexo dos animais positivos a infecção por *L. infantum* nas técnicas de IFI e qPCR. Para este último, a nível estatístico, ambos demonstraram um valor de significância de $p=0,001$ e $p=0,005$, respectivamente. Revelando assim, uma possível associação entre presença dos vírus estudados e o sexo masculino (Tabela 16). De referir, que a amostra é pouco representativa não se podendo deste modo, aferir resultados conclusivos.

Tabela 16. Resultados estatísticos obtidos para os gatos testados para FIV e FeLV.

	FeLV		FIV	
	X^2	p	X^2	p
Idade	0,530	0,460	0,212	0,379
Sexo	0,038	0,005	0,041	0,001
Raça	0,344	0,801	0,332	0,322

Legenda: FIV: Vírus da Imunodeficiência Felina; FeLV: Vírus da Leucemia Felina; X^2 : Teste de Qui-Quadrado; p = índice de significância

4.7. Limitações do estudo

O presente estudo foi efectuado numa população de 80 felinos (40 gatos de cada área geográfica) o que representa uma amostra com um número relativamente reduzido de animais, não podendo deste modo, retirar conclusões absolutas sobre a prevalência na população felina nestes distritos. De salientar que as limitações económicas e a disponibilidade e aceitação dos proprietários dos animais para a colheita de sangue dificultou a obtenção e avaliação dos resultados.

O material biológico colhido (sangue total), como já foi referido anteriormente, não é o ideal para a pesquisa de ADN do protozoário, visto que as formas amastigotas dificilmente se

encontram em circulação. Neste contexto, poderiam ter sido efectuadas também colheitas de medula óssea e/ou linfonodos de modo a aumentar a fiabilidade das técnicas de diagnóstico, embora tal fosse pouco viável devido à não adesão por parte dos proprietários.

A escassa informação sobre os animais errantes em estudo limitou a análise de diversas variáveis que foram estudadas e avaliadas para os animais domésticos.

Por fim, os testes de diagnóstico para FIV e FeLV realizados aos gatos com resultados positivos para infecção por *Leishmania infantum*, não permitiram retirar conclusões sobre a associação entre o desenvolvimento de infecção pelo parasita e a presença dos vírus imunossupressores. Deveriam ter sido avaliados todos os animais da amostra total, no entanto, as limitações económicas não o permitiram.

5. Discussão

A LV representa um problema crescente a nível médico-veterinário, mas torna-se também importante devido ao seu carácter zoonótico. No período compreendido entre 2000 e 2009 foram diagnosticados, na Unidade de Leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), 173 novos casos de Leishmaniose visceral humana. No caso da Lcan, esta pode mesmo atingir uma prevalência de cerca de 20% nas regiões endémicas da doença (Campino & Maia, 2010). Não obstante, a par com o que se tem observado para os cães e para o Homem, nos últimos anos tem-se vindo a registar também um aumento considerável de casos de Lfel especialmente em áreas endémicas de Lcan e Lhum, levantando questões acerca da importância dos felinos na epidemiologia da doença. Segundo a literatura, os gatos além de hospedeiros acidentais, podem actuar também como hospedeiros reservatórios em áreas endémicas (Maia & Campino, 2011) e ser fonte de infecção para os vectores (Maroli *et al.*, 2007; Magno da Silva *et al.*, 2010).

O presente estudo foi efectuado em dois distritos com características edafoclimáticas distintas e localizados um na zona litoral (AML) e o outro na região interior (Viseu). Sabe-se que a Lcan é considerada uma doença endémica no nosso país existindo regiões em que a endemicidade é superior como é o caso da região de Lisboa-Setúbal, do Algarve, do Alentejo, de Trás-os-Montes e Alto Douro e de alguns concelhos da região da Beira Interior (Cardoso, 2004). Mais recentemente, o estudo efectuado por Cortes *et al.* (2012) revelou, através do TAD, uma seroprevalência de 7,09% (11/167) de cães positivos a *Leishmania infantum* no distrito de Viseu, enquanto a AML registou um valor de 5,85% (42/773), evidenciando deste modo uma maior prevalência de cães infectados na região de Viseu.

Em concordância com o anterior, no nosso estudo, as prevalências registadas para os felinos, para o distrito de Viseu também se revelaram superiores quando comparadas com as da AML. No distrito de Viseu obteve-se seroprevalências 25% (10/40) de gatos positivos para a infecção por *L. infantum* e na AML apenas 12,5% (5/40) (Anexo VI).

Embora não haja estudos realizados concomitantemente sobre a actividade dos insectos vectores e a presença de infecção pelo parasita nos gatos na região de Viseu, este município situado na zona interior, possui características edafoclimáticas e geográficas diferentes quando comparado com a AML localizada na zona litoral. Apresenta índices de humidade superiores, temperaturas não tão elevadas durante todo o ano, é atravessado por quatro rios (Rio Vouga, Pavia, Paiva e Dão) e é constituído ainda por várias serras (Serra do Caramulo, Buçaco, Estrela, Leomil e Montemuro). Todas estas características fornecem-lhe as condições adequadas para a multiplicação e desenvolvimento dos insectos vectores. Na AML já foram desenvolvidos estudos que confirmam a presença de populações dos flebotomíneos *P. ariasi*, *P. perniciosus* e *S. minuta* e foram encontradas fêmeas de *P. ariasi* (3/229) e *P. perniciosus* (2/79) infectadas por *Leishmania* (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Dos animais positivos à infecção por *Leishmania*, 52,2% (12/23) pertenciam ao sexo feminino e a média de idades dos animais domésticos da amostra rondava os 7 anos e 6 meses, o que se encontra de acordo com o estudo efectuado por Pennisi (2002) que confirma a predisposição para o sexo feminino e uma idade superior a 2 anos nos animais positivos. No entanto, alguns autores referem não haver qualquer tipo de associação entre a presença de infecção e o sexo dos animais (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Tabar *et al.*, 2008; Nasereddin *et al.*, 2008; Diakou *et al.*, 2009).

Por outro lado, os animais mais velhos têm maior probabilidade de serem infectados por *Leishmania*, uma vez que tiveram maior tempo de exposição ao insecto vector, que os animais jovens (Baneth *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2010).

Quanto à predisposição racial, considerando apenas os gatos domésticos analisados, os resultados obtidos foram de 46,15% (6/13) para a raça Europeu Comum, 15,38% (2/13) pertenciam à raça Persa e 38,46% (5/13) eram de raça indeterminada. Embora em diversos estudos realizados, pareça não existir predisposição racial (Tabar *et al.*, 2008; Diakou *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2010), Navarro *et al.* (2010) verificaram que a raça Europeu Comum era a mais afectada.

Tendo em conta os resultados dos inquéritos realizados aos donos dos gatos domésticos, verificou-se que a maioria dos animais do GDL (60%) e alguns do GDV (25%) apresentava doenças concomitantes, sendo as mais comuns: Insuficiência Renal Crónica (IRC), Diabetes

Mellitus e Hipertiroidismo. No entanto, em nenhum dos animais se suspeitou de Lfel como doença primária. Nos cães, sabe-se que a IRC pode ser uma consequência do desenvolvimento de Leishmaniose (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Já nos felinos, embora tenham sido identificados casos de insuficiência renal (Pennisi, 2002; Navarro *et al.*, 2010), não está provado que estes estejam directamente relacionados com a infecção por *Leishmania*. No presente estudo, e em nossa opinião, doenças do foro endócrino destes animais provavelmente estão associadas à sua idade avançada.

No que diz respeito ao *habitat* dos gatos domésticos em estudo, 65% dos do GDL e 60% dos do GDV co-habitavam com outros animais, maioritariamente gatos e cães, existindo ainda dois casos em Viseu que viviam um com uma tartaruga e o outro com um periquito. Em 1986, Kilick-Kendrick *et al.* confirmaram a existência de uma espécie de flebotómíneos (*Sergentomyia minuta*) como vectora de leishmanias do subgénero *Sauroleishmania*, cuja presença tem sido referida em répteis (Afonso & Alves-Pires, 2008). Embora se tenha conhecimento de que esta espécie vectora seja abundante na região do Algarve, desconhece-se até à data, casos de infecção por este subgénero no nosso País.

No que diz respeito às aves, Otranto *et al.* (2010) realizaram um estudo em que infectaram 19 galinhas com *Leishmania infantum* e concluíram que embora se tenha conhecimento de que esta espécie possa ser uma fonte de alimentação para os flebotómíneos os resultados do presente estudo confirmaram que as galinhas não são hospedeiros adequados para *L. infantum*. Os resultados negativos da cultura de tecidos, a ausência de sinais clínicos e de soroconversão durante todo o período de estudo mostraram evidências de que experimentalmente galinhas infectadas não foram susceptíveis à infecção por *L. infantum*. Uma das razões para tal acontecimento prende-se com algumas características fisiológicas destes animais (por exemplo, temperatura do corpo elevada) que pode impedir galinhas e outras aves de se comportarem como hospedeiros do parasita (Otranto *et al.*, 2010). Embora, em Portugal, não existam casos reportados de infecção por *Leishmania* em quelónios e em psitacídeos no seguimento do que foi supracitado estas espécies não consideradas com uma fonte de possível infecção para os flebotómíneos.

Ainda sobre este tema, num dos casos de GDL o felino partilhava o seu *habitat* com um cão com Lcan e sob tratamento. Contudo, este gato não exibia qualquer sinal clínico e o resultado das técnicas de IFI e de qPCR para pesquisa da infecção por *Leishmania* revelaram-se negativas. Na nossa opinião ainda que estes insectos vectores tenham preferência para se alimentar nos cães (Alves-Pires, 2000) este gato pode não ter produzido uma quantidade suficiente de anticorpos anti-*Leishmania* detectáveis pela técnica de IFI. Outra hipótese seria

este animal estar numa fase final da infecção que o seu organismo conseguiu superar e por isso a carga parasitária não ser detectável pela técnica de qPCR. Finalmente outra hipótese seria o animal nunca ter sido infectado.

No nosso rastreio, para o diagnóstico de infecção por *L. infantum* nos gatos, foram utilizados dois métodos, um serológico (IFI) e outro molecular (qPCR), obtendo-se pela técnica de IFI (diluição 1:40) 15 (16,8%) animais positivos e 8 (11,3%) pela técnica de qPCR (com carga parasitária entre 100 a 500 cópias de moléculas de plasmídeo). Dos felinos positivos à infecção por *L. infantum* foram todos considerados assintomáticos, mesmo aqueles cujo as amostras foram qPCR-positivos.

Para a técnica de IFI (diluição 1:40) 16,8% dos gatos apresentaram resultado positivo, posteriormente os mesmos animais foram testados com uma diluição superior (1:80) obtendo todos resultados negativos. Após análise estatística dos dados, não obtivemos qualquer relação entre a hemólise do soro e o respectivo resultado obtido na IFI, concluindo-se então que não há relação pelo teste Qui-quadrado (χ^2) uma vez que $p=0,611$.

A técnica de IFI avalia a resposta imunitária humoral do hospedeiro à infecção por *L. infantum* e tem sido utilizada em gatos para este fim. Nenhuma das amostras seropositivas atingiu a titulação *cut-off* de 1:80 utilizada para os cães infectados com *Leishmania*, o que pressupõe uma resposta imunitária felina à infecção por *Leishmania* distinta da canina. Embora a IFI seja uma técnica muito sensível para diagnosticar Lcan e Lhum em Portugal, o mesmo não se verifica quando se trata do gato, uma vez que o título de anticorpos produzidos por estes animais é muito reduzido. Uma das causas que pode explicar a baixa produção de anticorpos pode estar relacionada com o facto da forma de Leishmaniose mais comum nos gatos ser a cutânea e não a visceral (Solano-Gallego *et al.*, 2007). Alguns autores sugerem também uma resistência natural desta espécie à infecção por este protozoário e justificam o mesmo com o tipo de resposta imunitária desenvolvida e com o passado genético dos gatos (Mancianti, 2004).

Diferenciando os resultados pelos 4 grupos estudados, as seroprevalências encontradas foram para a AML 20% (4/20) para o GDL e 5% (1/20) para o GEL e para os grupos de Visau – GDV e GEV – o valor apresentado foi o mesmo 25% (5/20). Evidenciando na AML, o dobro da prevalência para os felinos domésticos quando comparados com os gatos errantes. Para ambos os grupos de gatos domésticos, as seroprevalências são elevadas como as que apresentaram Maia *et al.* (2010) no seu estudo. Existem vários factores que podem influenciar estes resultados, como é caso de serem animais domésticos que têm acesso ao exterior das habitações onde vivem (*e.g.* varandas, quintais, terraços) assim como possuírem uma média

de idades de 8 anos o que favorece uma maior exposição aos flebotomíneos infectados, podendo justificar os resultados. Neste contexto, Silva *et al.* (2008), defendem que os gatos domésticos ao realizarem incursões nas áreas periurbanas e rurais podem actuar como um elo entre os ambientes silvestre e doméstico, favorecendo a disseminação do parasita.

Quanto às menores taxas de anticorpos observadas nos gatos errantes deste estudo, podem estar associadas ao facto de serem animais mais jovens, que não contataram com tantas épocas de transmissão do parasita como os gatos domésticos. Por outro lado, como estes animais vivem na rua e estão expostos a um maior número de agentes infecciosos e de agressões ambientais, poderão ter desenvolvido resistências naturais que lhes conferiram uma imunidade mais sólida contra a infecção por *Leishmania*. No entanto, esta hipótese carece de averiguação através de estudos imunológicos, que saem do âmbito desta dissertação.

Em Portugal, estudos epidemiológicos baseados em várias técnicas serológicas indicam prevalências de infecção por *Leishmania* em gatos, pela técnica de IFI, de 1,03% (Vaz *et al.*, 2005), de 0% (Faria, 2008; Rosa, 2009), de 0,6% (Duarte *et al.*, 2010) e de 1,32% (Maia *et al.*, 2010).

Cardoso *et al.* (2010), através da técnica de ELISA e pelo TAD, obtiveram seroprevalências de 2,84% e 1,9%, respectivamente. Em todos os estudos, o valor de anticorpos anti-*Leishmania* era muito inferior quando comparado com os valores obtidos em estudos semelhantes realizados aos cães.

Simões-Mattos *et al.* (2005) realizaram um estudo onde verificaram que o período durante o qual os gatos manifestaram lesões cutâneas activas que continham parasitas, não apresentavam títulos de anticorpos anti-*Leishmania* significativos de desenvolvimento da doença. Os mesmos autores aferiram também que a seroconversão média dos títulos de anticorpos ocorreu quando estas lesões já se encontravam em fase de resolução e que o pico de produção de anticorpos apenas se registou 20 semanas pós-infecção. Sugerindo que os métodos serológicos por si só não são indicados para o diagnóstico de Lfel. No presente estudo, os resultados obtidos pela técnica de IFI não se encontram de acordo com os obtidos pela técnica de qPCR o que corrobora o que foi dito anteriormente.

Do ponto de vista epidemiológico, a presença de gatos sem sinais clínicos e com uma reduzida produção de anticorpos anti-*Leishmania* (Maia *et al.*, 2008) ou mesmo a ausência de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de gatos com lesões cutâneas activas (Simões-Mattos *et al.*, 2005) pode contribuir para uma falha no diagnóstico e consequentemente para uma subestimação do número real de animais desta espécie infectados pelo protozoário, aumentando deste modo a possibilidade de transmissão e disseminação do parasita.

As técnicas moleculares têm como objectivo identificar e amplificar o ADN do parasita em questão, ou seja avaliam a presença ou ausência do parasita no sangue dos gatos. A técnica de qPCR foi apenas efectuada em 71 animais da amostra obtendo prevalências de 10% (2/20) de positivos em cada grupo. No total da amostra a prevalência foi de 11,3%. As cargas parasitárias foram calculadas através do número de moléculas de plasmídeo recombinante utilizado para calcular as curvas “standard”. Assim, o número de moléculas de plasmídeo nos felinos infectados variou entre 100 a 500 moléculas.

Em Portugal, têm sido efectuados estudos recorrendo à técnica de PCR (isolada ou em combinação com outros métodos) para o diagnóstico de infecção por *Leishmania infantum*. Neste contexto, Maia *et al.* (2008) obtiveram uma prevalência de 30,4% em 23 gatos analisados com cargas parasitárias (CP) entre 0.4 a 8,6 leishmanias/ng de ADN do gato.

No nosso estudo, os dados obtidos foram inferiores (11,3%), o que pode ser devido ao tamanho da amostra ou a uma diminuição na taxa de infecção por este parasita. Este facto pode estar provavelmente relacionado com a crescente preocupação que se tem vindo a verificar relativamente à Lcan. O aumento da informação transmitida sobre a doença aos proprietários de cães, o desenvolvimento da vacina e a aplicação de medidas profiláticas mais eficazes podem ter contribuído para a diminuição da taxa de infecção para os flebotomíneos e consequentemente para a diminuição da infecção por *Leishmania* nos gatos.

Um dado importante com que nos deparamos na interpretação dos resultados das duas técnicas laboratoriais, foi que nenhum dos animais seropositivos apresentou simultaneamente positividade pela técnica de qPCR e o contrário também não se verificou.

Os resultados serológicos obtidos pela técnica de IFI sugerem a presença de infeções por *Leishmania infantum* antigas ou muito recentes não podendo, em raros casos, ser afastada a hipótese de reações inespecíficas com agentes patogénicos ainda não determinados.

De salientar, que o *kit* para a realização da técnica de IFI foi originalmente concebido para o diagnóstico da infecção nos caninos, a qual apresenta uma resposta imunitária à presença de *Leishmania* muito diferente da dos gatos, e que neste trabalho optamos por utilizar um *cut-off* de 1:40 tendo em consideração a mais fraca resposta imunológica face à infecção por este protozoário.

Os resultados moleculares da técnica de qPCR, sugerem uma reduzida carga parasitária insuficiente para desencadear a doença, podendo-se, ainda, questionar, se estes animais se encontram na fase de resolução ou na fase inicial da infeção considerando os baixos títulos de anticorpos e a reduzida carga parasitária.

Neste contexto, o ideal teria sido testar os gatos errantes e domésticos do presente estudo em diferentes períodos porque alguns deles poderão (ou não) ter níveis de parasitémia ou de anticorpos abaixo do limiar de deteção das técnicas moleculares e serológicas que foram utilizadas, e como tal serem falsos negativos.

Ao que se sabe, não existe até à data nenhum estudo publicado que demonstre a resposta imunitária celular e humoral felina à infecção por *Leishmania* spp. Seria essencial avaliar a resposta imunitária desta espécie para determinar se a razão pela qual estes animais normalmente não desenvolvem sinais clínicos ou altos níveis de anticorpos é devido a um equilíbrio entre o seu sistema imunitário e a presença do parasita ou se eles conseguem controlar a infecção através da destruição do protozoário (Poli *et al.*, 2002).

Rastreios epidemiológicos de *Lfel* realizados na Península Ibérica, pelas técnicas de PCR e IFI utilizando como material biológico o sangue, indicam prevalências de 25,7% (PCR) e 28,3% (IFI) (Martin-Sanchez *et al.*, 2007) em Espanha e de 1,32% (PCR) e 20,3% (IFI) em Portugal (Maia *et al.*, 2010). Alguns autores em Portugal, avaliaram diferentes períodos, um de transmissão da doença (Junho - Setembro) e outro em que não há praticamente desenvolvimento dos vectores e portanto sem grandes hipóteses de transmissão (Outubro – Maio). No primeiro caso registaram-se valores de 18,5% de gatos infectados e no segundo de 22%, o que demonstra que os felinos que vivem em regiões endémicas de Leishmaniose estão constantemente em contacto com o parasita (Maia *et al.*, 2010). No seguimento deste estudo, os gatos com pelo menos um ano de idade já contactaram com duas épocas de transmissão, ou seja, no nosso rastreio, como os gatos mais jovens têm no mínimo um ano, significa que todos os felinos do estudo contactaram com mais de uma época de transmissão do parasita.

A sequenciação do ADN do parasita dos gatos infectados no nosso rastreio revelou-se inconclusiva devido à baixa concentração de ADN das amostras. Contudo considerando o método de funcionamento da técnica de qPCR com sonda (que não é permissiva a “mispriming”) e a informação epidemiológica sobre a doença no nosso País, é com alguma segurança que se pode afirmar que se trata da espécie *Leishmania infantum*. Sabe-se que a espécie e zimodeme - *L. infantum* zimodeme MON-1, é responsável pela maioria dos casos de Lcan e Lhum na bacia do Mediterrâneo e foi até à data o único isolado a partir de gatos infectados (Maia & Campino, 2011). Em vários países como é o caso de Portugal, Brasil, Itália e Irão a genotipagem de ADN do parasita isolado a partir diferentes tecidos de gatos (nomeadamente sangue, linfonodo, pele, medula óssea, fígado, baço e rins) que viviam em áreas endémicas da doença já foi realizada identificando todos os parasitas pertencentes à espécie *L. infantum* (Maia & Campino, 2011). Recentemente em Portugal, Oliveira (2011)

testou 50 gatos errantes da região de Setúbal e apenas um animal obteve um resultado positivo a qPCR para a infecção por *Leishmania*, que após sequenciação revelou uma identidade de 99% com a espécie *L. infantum*.

Existem ainda algumas divergências sobre a susceptibilidade dos gatos domésticos para a infecção por *Leishmania* spp. e a sua associação com a infecção por vírus imunossupressores. O vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV) são retrovírus responsáveis por duas das doenças infecciosas mais comuns e que põem em risco o bem-estar e a vida dos gatos em todo o mundo. Supõe-se que gatos com estas doenças possam estar mais susceptíveis à infecção por *Leishmania* spp.

No nosso estudo foi avaliado a presença destes dois vírus apenas nos gatos positivos com o objectivo de confirmar esta associação, como defendem alguns autores (Poli *et al.*, 2002; Grevot *et al.*, 2005; Rufenacht *et al.*, 2005; Martin-Sanchez *et al.*, 2007; Sobrinho *et al.*, 2012). Os resultados obtidos, um gato seropositivo a FIV e dois gatos positivos a antígeno de FeLV ($p > 0,005$) apoiam a ausência da possível associação entre a presença dos vírus imunossupressores e a positividade para a infecção por *Leishmania* spp. Contudo, neste estudo não é possível retirar conclusões uma vez que deveriam ter sido testados também para FIV e FeLV os 57 animais negativos para a infecção por *Leishmania* spp. Estatisticamente, parece haver predisposição para o sexo masculino e a infecção por FIV e/ou FeLV no nosso estudo ($p=0,001$ e $p=0,005$, respectivamente). Embora o número de animais seja bastante reduzido, não se pode aferir que a nível global, o sexo masculino seja o mais afectado por estes vírus. No entanto, segundo a literatura, os gatos machos têm maior risco de adquirir a infecção devido ao seu comportamento agressivo de morder por questões de dominância.

Sobrinho *et al.* (2010) realizaram um estudo onde analisaram 221 gatos dos quais 13,6% (30/221) foram positivos à infecção por *Leishmania* spp. (diagnóstico realizado por métodos parasitológicos e serológicos). Destes 30 animais, 25 apresentavam resultados negativos para FIV e FeLV e apenas 5 possuíam anticorpos contra FIV e evidência de infecção por *Leishmania* spp. Estes resultados sugerem também a ausência da possível associação entre infecção *Leishmania* spp., FIV e/ou FeLV,

Na infecção pelo FIV há uma diminuição da relação dos linfócitos T $CD4^+/CD8^+$. As causas da diminuição da concentração de linfócitos T $CD4^+$ incluem o decréscimo na sua produção devido à infecção da medula óssea e do timo, a lise das células infectadas devido ao efeito citopático do vírus, destruição das células infectadas pelo sistema imunitário e morte por apoptose (Hartmann, 2011). A perda de linfócitos T $CD4^+$ só por si pode influenciar o estado imunitário, pois estas células desempenham um papel importante na promoção e manutenção

da resposta imunitária humoral e celular. No caso do FeLV, após o desenvolvimento de virémia, o vírus atinge rapidamente os tecidos alvo, constituídos por células de rápida divisão celular - linfóides, mielóides e epiteliais. Embora o mecanismo de imunossupressão não se encontre completamente clarificado têm sido identificadas como possíveis causas a atrofia do timo, neutropénia, linfopénia (perda de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$) e alteração da função dos neutrófilos (Hartmann, 2011).

Estes vírus imunossupressores prejudicam a resposta imunitária celular e humoral dos felinos, ficando o sistema imune enfraquecido o que pode favorecer a multiplicação e a disseminação visceral de *Leishmania* spp. nos gatos.

No nosso estudo foram também avaliados diversos factores considerados de risco para a infecção por *L. infantum* entre eles várias condições associadas ao tipo de vida dos gatos domésticos, como: a proveniência dos animais, o tipo de habitat, o contacto com outros animais, a presença de crianças e/ou idosos no agregado familiar, a realização de profilaxia contra ectoparasitas e presença de doenças concomitantes. Após análise estatística nenhum destes parâmetros apresentou valores significativos ($p>0,05$) quando associados com os resultados obtidos pela técnica de IFI (diluição 1:40), à excepção do uso de profilaxia, apresentando um índice de significância de $p=0,009$. De salientar, que a utilização do teste Qui-quadrado como método estatístico possui algumas limitações. Neste estudo pode gerar efeitos de confusão resultantes da associação entre as variáveis explicativas, por exemplo ao analisar estatisticamente a técnica de IFI com a profilaxia contra ectoparasitas ($p=0,009$, resultado significativo) tem que se ter em conta outros factores que podem contribuir para esta associação, como é caso, de serem ou não animais com acesso ao exterior ou de possuírem ou não outra doença.

O uso de um tratamento insecticida de aplicação tópica em cães tem sido eficaz na redução da incidência da Lcan e da Lhum. O recurso aos piretróides como medida profilática em cães surge como uma limitação para controlar a infecção nos gatos. O facto destes animais estarem protegidos contra ectoparasitas não significa que estejam protegidos contra a acção dos flebotómíneos. Ainda não há no mercado nenhum produto testado para gatos com acção contra o insecto vector, embora tenha sido lançada recentemente a coleira Seresto®. Esta apresentação para cães e gatos possui efeito sinérgico entre o imidaclopride e a flumetrina, mas ainda estão em curso estudos para avaliar a sua eficácia repelente contra mosquitos e flebótomos.

Os resultados obtidos neste estudo mostram uma elevada prevalência de infecção por *Leishmania infantum* em gatos em ambas as áreas geográficas estudadas, sugerindo que gatos

que habitem em zonas endémicas da doença estão frequentemente expostos aos insectos vectores e consequentemente a *Leishmania* spp.

IV - CONCLUSÃO

O estágio realizado no IVP contribuiu para a aquisição de competências fundamentais para o desenvolvimento futuro da actividade profissional nos departamentos de Medicina Interna, Cirurgia e Imagiologia da área de Clínica de Animais de Companhia.

O desenvolvimento desta dissertação proporcionou à autora aprofundar conhecimentos teóricos e adquirir noções práticas de técnicas laboratoriais e da área de investigação.

Relativamente ao tema escolhido, nos últimos anos, o aumento do número de casos reportados a nível mundial de Lfel tem levantado questões acerca da importância dos felinos na epidemiologia da doença. No entanto, a prevalência verdadeira de gatos infectados com *Leishmania* spp. e a resposta à infecção por este protozoário nesta espécie não está ainda esclarecida. Sabe-se, contudo, que os felinos além de hospedeiros acidentais, podem também actuar como hospedeiros reservatório em áreas endémicas, e ser fonte de infecção para os vectores. O facto de as preferências de alimentação dos flebotomos incluírem, além dos caninos, os felinos, torna os animais que residam em zonas endémicas de Lhum e Lcan, expostos à picada de flebotómios, e portanto à possível infecção por *Leishmania* spp.

O rastreio epidemiológico efectuado na AML e em Viseu, regiões por si só detentoras de elevadas prevalências de Lcan, revelaram que os felinos residentes nestas áreas geográficas também podem ser susceptíveis à infecção por *Leishmania infantum*.

Embora as prevalências obtidas pelas técnicas de IFI (16,8%) e de qPCR (11,3%) não demonstrem percentagens muito elevadas, há que ter em conta que apenas foram estudados 40 gatos de cada área geográfica e que deste modo o diagnóstico desta parasitose possa estar a ser subestimado. Uma das causas que pode estar a contribuir para este resultado é o facto das características clínicas associadas à infecção por *L. infantum* não serem patognomónicas podendo ser confundidas com outras doenças mais comuns do gato resultando em uma menor detecção de casos de infecção por este protozoário. Deste modo, sempre que um gato apresentar lesões cutâneas, um dos diagnósticos diferenciais que se deve ter em especial atenção é o da infecção por *L. infantum*.

Os proprietários dos gatos de ambos os distritos devem ser alertados para a possibilidade de infecção dos seus gatos e devem ser adoptadas medidas de profilaxia contra o parasita.

Considerando o carácter zoonótico desta doença, este rastreio pode abrir portas para o desenvolvimento de estudos mais aprofundados sobre o papel de hospedeiro reservatório de *Leishmania infantum* na espécie felina não só na AML e em Viseu, mas também a nível

nacional. Será fundamental o esclarecimento do papel epidemiológico do gato quer a nível de Saúde Animal quer a nível de Saúde Pública.

Como perspectivas futuras seria importante fazer um rastreio de *Lfel* a nível nacional que englobasse todos os distritos, para averiguar quais as verdadeiras prevalências da doença nos felinos e qual o seu verdadeiro papel como reservatório do parasita para as espécies canina e humana. E simultaneamente, efectuar estudos mais diversificados pelo território português sobre a actividades dos insectos vectores.

Também seria interessante avaliar a resposta imunitária desta espécie à infecção por *Leishmania* spp., assim como, avaliar o tipo de imunoglobulinas que os felinos produzem aquando da infecção por este parasita recorrendo a um proteinograma e comparando os resultados com os estudos efectuados para os cães.

Outra questão fundamental que deve ser abordada no futuro, é como prevenir a infecção pelo parasita em gatos, visto que não existem para já repelentes contra flebótomos, que possam ser usados nestes animais.

V - BIBLIOGRAFIA

- Abda, I.B., Monbrison, F., Bousslimi, N., Aoun, K., Bouratbine, A. & Picot, S. (2011). Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105, pp. 17–22.
- Afonso, M. & Alves-Pires, C. (2008). Capítulo II: Bioecologia dos vectores. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., 2008, pp. 27-40.
- Alexandre-Pires, G.M. & Correia, J.J. (2008). Capítulo IV: Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In G.M. Santos-Gomes & I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina*. (pp. 53-68). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações.
- Alexandre-Pires, G., Villa de Brito, M.T., Algueró, C., Martins, C., Rodrigues, O.R., Pereira da Fonseca, I. & Santos-Gomes, G. (2010). Canine leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 137, pp. 275–283.
- Alves-Pires, C. (2000). Os flebótomos (*Diptera, Psychodidae*) dos focos zoonóticos de leishmanioses em Portugal. Tese de doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Edição do Autor, pp 9-17.
- AML (2007). Área Metropolitana de Lisboa – Território. Acedido a 31 de Julho de 2012, disponível em: <http://www.aml.pt/web/index.php?&iLevel1=gaml&iLevel2=territorio&iContent=index.html>
- Ayllon, T., Tesouro, M., Amusategui, I., Villaescusa, A., Rodriguez-Franco, F. & Sainz, A. (2008). Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. *Ann N Y Acad Sci.*, December 2008, 1149, pp. 361-364.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitology*, 24 (7), July 2008, pp. 324-30.
- Bates, P.A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37 (10), August 2007, pp. 1097–1106.
- Bergeon, M.P. (1927). Un cas de leishmaniose chez le chat. *Bulletin de la Societá Veterinaria de Lyon*, 30, 92-93.
- Boarino, A., Bollo, E., Prunotto, L., Canale, L., Uslenghi, F. & Poletti, P. (2008). Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 31 (6), November 2008, pp.527–536.
- Boggiatto, P.M., Gibson-Corley, K.N., Metz, K., Gallup, J.M., Hostetter, J.M., Mullin, K. & Petersen, K. (2011). Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5 (4), April 2011, pp.1019.
- Bonfante-Garrido, R., Valdivia, O., Torrealba, J., García, M.T., Garófalo, M.M., Urdaneta, I., Urdaneta, R., Alvarado, J., Copulillo, E., Momen, H. & Grimaldi-Jr., G. (1996). Cutaneous

leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *venezuelensis*. Revista Científica, 6, 187-190.

- Bongiorno, G., Habluetzel, A., Khoury, C. & Maroli, M. (2003). Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Tropica*, 88 (2), October 2003, pp. 109–116.
- Bosselut, H. (1948). Un cas de leishmaniose générale du chat. *Archives de L'Institut Pauster D'Algérie*, 26, 14.
- Burchmore, R.J.S & Barrett M.P. (2001). Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *International Journal for Parasitology*, 31 (12), October 2001, pp. 1311–1320.
- Brumpt, E. (1949). In: *Parasites Animaux, Précis de Parasitologie*. Editor: E. Brumpt, 6ª edição. Masson et Cie Boulevard Saint-Germain, Paris, France, 248-256.
- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 23, pp. 859-864.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., *et al.* (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine & International Health*, 11(11), pp. 1708-1714.
- Cardoso, L., Lopes, A.P., Sherry, K. & Schallig, H. (2010). Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Veterinary Parasitology*, 174 (1–2), November 2010, pp. 37–42.
- Cardoso, L.M.M.L. (2004). Estudos de infecção canina por *Leishmania* no Alto Douro. Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Cardoso, L. Santos, H., Cordeiro-da-Silva, A., Pratlong, F., Dedet, J.P. & Rodrigues, M. (2002). *Leishmania infantum* MON-98: infection in a dog from Alto Douro, Portugal. *Acta Tropica*, 83, pp. 83-85.
- Carvalho, G.M., Andrade Filho, J.D., Falcao, A.L., Rocha Lima, A.C. & Gontijo, C.M. (2008). Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Disease*, June 2008; 8(3), pp. 407-414.
- Cidade de Viseu, 2008. Acedido a 1 de Agosto de 2012, disponível em: <http://www.cidadeviseu.com/viseu>
- Cohen-Freue, G., Holzer, T.R., Forney, J.D. & McMaster W.R. (2007). Global gene expression in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 37 (10), August 2007, pp. 1077-1086.
- Corrales, G.M. & Moreno, R.M. (2006). Leishmaniosis canina: Manejo Clínico y Situación Actual en España. ISBN-10: 84-690-1057-3, pp 15-56.
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. & Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, April 2012, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.028>

- Cortes, S., Mauricio, I., Almeida, A., Cristovão, J.M., Pratlong, F., Dedet, J.P. & Campino, L. (2006). Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology Internacional*, 55 (7), December 2006, pp. 277-283.
- Costa, T.A.C., Rossi, C. N., Laurenti, Gomes, A.A.D., Vides, J.P., Sobrinho, L.S.V., Costa, D.C. & Marcondes, M. (2009). Use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of Leishmaniasis in Cats. In World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings.
- Costa, T.A.C. (2008). Utilização da Técnica de ELISA com Proteína A e Anti-IgG para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose visceral felina. Tese de mestrado em Ciência Animal. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista.
- Costa-Durão, J., Rebelo, E., Peleteiro, M., Correia J. & Simões, G. (1994). Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis Catus Domesticus*): Nota Preliminar, *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Volume 89, n.º 551, Julho/Setembro 1994, 140-144.
- Coutinho, M.T.Z. & Linardi, P.M. (2007). Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology*, 147 (3-4), July 2007, pp. 320-325.
- Coutinho, M.T., Bueno, L.L., Sterzik, A., Fujiwara, R.T., Botelho, J.R., Maria, M., Genaro, O. & Linardi, P.M. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 128, pp. 149-155.
- Craig, T.M., Barton, C.L., Mercer, S.H., Droleskey, B.E. and Jones, L.P. (1986). Dermal leishmaniasis in a Texas cat. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35, 1100-1102.
- Diakou, A., Papadopoulos, E. & Lazarides, K. (2009). Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, pp. 728-730.
- Duarte, A., Castro, I., Fonseca, I.M., Almeida, V., Carvalho, L.M., Meireles, J., Tavares, L. & Vaz, Y. (2010). Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, pp. 441-444.
- Faria, T. (2008). Estudo sero-epidemiológico da infecção por *Leishmania infantum* em cães e gatos do município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de imunofluorescência indirecta. Dissertação de Mestrado. Afonso, F. (Orientador), Pereira da Fonseca, I. (Co-orientador), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Ferreira, M.G.P.A., Fattori, K.R., Souza, F. & Lima V.M.F. (2009). Potencial role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Veterinary Parasitology*, 165 (1-2), October 2009, pp. 150-154.
- Ferroglio, E., Romano, A., Trisciuglio, A., Poggi, M., Ghiggi, E., Sacchi, P. & Biglino, A. (2006). Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, pp. 636-641.
- Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sanchez, A. & Roura, X. (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 137, pp. 214-221.

- Freitas, E., Melo, M.N., Costa-Val, A.P. & Michalick, M.S.M. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 137 (1-2), April 2006, pp. 159-167.
- Gluezn, E., Ginger, M. L. & McKean, P. G. (2010). Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. *Curr Opin Microbiol* 13, pp. 473-479.
- Gomes, Y.M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R.A., Abath, F.G.C. & Alves L.C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, 175, pp. 45–52.
- González, A.F. (2006). Hospital Veterinario Sierra Oeste: articulos H.V.S.O. Acedido a 6 de Setembro de 2012, disponível em: http://www.hvsierraoste.com/paginas/articulos_hvso.html
- Gossage, S.M., Rogers, M.E. & Bates P.A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, 33 (10), September 2003, pp. 1027–1034.
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181, pp. 23-30.
- Gramiccia, M. & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35 (11-12), October 2005, pp. 1169–1180.
- Greene, C.E. (2006). Section IV: Protozoal Diseases. Chapter 73: Leishmaniasis. In *Infectious Diseases of the dog and cat* (3th ed.). (pp. 685 – 698). St. Louis, Missouri USA: Saunders Elsevier.
- Grevot, A., Hugues, J.P., Marty, P., Pratlong, F., Ozon, C., Haas P., Breton, C. & Bourdoiseau (2005). Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite*, 12, 271-275.
- Handman, E., Bullen, D.V.R. (2002). Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends parasitology*, 18 (8), August 2002, pp. 332–334.
- Harhay, M.O., Oliaro, P.L., Costa, D.L. & Costa, C.H. (2011). Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitology*, September 2011; 27(9), pp. 403-409.
- Hartmann, K. (2011). Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143, pp. 190-220.
- Hervás, J., Chacon-Manrique DeLara, F., Sanchez-Isarria, M., Pellicer, S., Carrasco, L., Castillo, J. & Gomez-Villamandos, J. (1999). Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 1(2), June 1999, pp. 101-105.
- Hide, M., Bañuls, A. & Tibayrenc, M. (2001). Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1. Epidemiological Implications (Versão online). Acedido em 7 de Junho de 2012, disponível em: <http://gemi.mpl.ird.fr/PDF/HidePARASITOLOGY2001.pdf>
- Hubálek, Z. & Rudolf, I. (2011). Chapter 6: Haematophagous Arthropods as Vectors of Diseases. In *Microbial Zoonoses and Sapronoses* (1th ed.) (pp. 73-74). New York, USA: Springer Science.

- Hubálek, Z. & Rudolf, I. (2011). Chapter 8: Systematic Survey of Zoonotic and Sapronotic Microbial Agents. In *Microbial Zoonoses and Sapronoses* (1th ed.) (pp. 280-282). New York, USA: Springer Science.
- Huebner, J., Müller, E., Langbein-Detsch, I., Naucke, T. & Kissingen, L.B. (2008). Serological Survey of *Leishmania* Infections in Cats From North Greece (resumo online). In *Proceedings of 26th Annual Forum of the American College of Veterinary Internal Medicine Conference 2008*. Acedido a 14 de Junho de 2012, disponível em: <http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=acvim2008&PID=pr23327&O=VIN>
- Instituto Nacional de Estatística (INE) (2010). Anuário Estatístico de Portugal 2010. Disponível em: http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CDMQFjAD&rl=http%3A%2F%2Fwww.ine.pt%2Fngt_server%2Fattachfileu.jsp%3Flook_parentBoui%3D13823559%26att_display%3Dn%26att_download%3Dy&ei=B21TUOOWKsSyhAff34G4DA&usg=AFQjCNG2j9ApGWqIYwMYf3QalwbnOzsniw
- Kamhawi, S. (2006). *Phlebotomine* sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, 22 (9), September 2006, pp. 439–445.
- Killick-Kendrick, R. (1999). Biology and control of *Phlebotomine* sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17 (3), May–June 1999, pp. 279–289.
- Kima, P.E. (2007). The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal for Parasitology*, 37, pp. 1087–1096.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, S., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A. & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (2-3), April-June 2006, pp. 95–125.
- Kuhls, K., Chicharro, C., Canavate, C., Cortes, S., Campino, L., Haralambous, C., Soteriadou, K., Pratlong, F., Dedet, J.P., Mauricio, I., Miles, M., Schaar, M., Ochsenreither, S., Radtke, O.A. & Schonian, G. (2008). Differentiation and Gene Flow among European Populations of *Leishmania infantum* MON-1. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 2 (7), July 2008, e261.
- Leifso, K., Cohen-Freue, G., Dogra, N., Murray, A. & McMaster W.R. (2007). Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 152 (1), March 2007, pp. 35–46.
- Leiva, M., Lloret, A., Peña, T. & Roura, X. (2005). Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Veterinary Ophthalmology*, January/February 2005, 8 (1), pp. 71-75.
- Lobsiger, L., Muller, N., Schweizer, T., Frey, C.F., Wiederkehr, D., Zumkehr, B. & Gottstein, B. (2010). An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Veterinary Parasitology*, 169 (3-4), May 2010, pp. 408–414.
- Lunedo, S.N., Thomaz-Soccol, V., de Castro, E.A. & Telles, J.E.Q. (2012). Immunocytochemical and immunohistochemical methods as auxiliary techniques for histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Acta Histochemica*, 114 (3), May 2012, pp. 252-258.
- Magno da Silva, S., Rabelo, P.F.B., Gontijo, N.F., Ribeiro, R.R., Melo, M.N., Ribeiro, V.M. & Michalick, M.S.M. (2010). First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Veterinary Parasitology* 174 (2010), pp.150–154.

- Maia, C. & Campino, L. (2011). A importância do gato doméstico (*Felis catus domesticus*) na epidemiologia da leishmaniose zoonótica. *Veterinary Medicine*, 13 (76), pp. 46-49.
- Maia, C. & Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, 27 (8), August 2011, pp. 341-344.
- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E. & Campino, L. (2010). Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 174, pp. 336-340
- Maia, C., Afonso, M.O., Neto, L., Dionísio, L. & Campino, L. (2009). Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 46, December 2009, pp. 268-272.
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J.M., Gonçalves, L. & Campino, L. (2009). Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*, January 2009, 179 (1), pp.142-144.
- Maia, C. & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158 (4), pp. 274-287.
- Maia, C., Nunes, M. & Campino, L. (2008). Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal, *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, 8 (4), 2008, Mary Ann Liebert, Inc.
- Maia, C., Rolão, N., Nunes, M., Gonçalves, L. & Campino, L. (2007). Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, 103 (2), August 2007, pp. 150-155.
- Mancianti, F. (2004). Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? *Parassitologia* 46 (1-2), pp. 203-206 (resumo online). Acedido a 7 de Junho de 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15305717>
- Marcos, R., Santos, M., Malhão, F., Pereira, R., Fernandes, A., Montenegro, L. & Roccabianca, P. (2009). Case report: Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis, *Veterinary Clinical Pathology*, American Society for Veterinary Clinical Pathology, 38 (2), March 2009, pp. 201-205.
- Maroli, M., Pennisi, M., DiMuccio, T., Khoury, C., Gradoni, L. & Gramiccia, M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 145 (3-4), April 2007, pp. 357-360.
- Martínez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O. & Altet, L. (2011). Canine Leishmaniasis: the key point for qPCR result interpretation. *Parasites & Vectors*, 4:57.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O. & Morillas-Mehlhorn, H. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, 145 (3-4), April 2007, pp. 267-273.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O. & Morillas-Mehlhorn, H. (2001). Biology, Structure, Function in *Encyclopedic Reference of Parasitology* (2nd ed.) (pp. 334-335), Berlin, Alemanha: Springer.

- McMahon-Pratt, D. & Alexander, J. (2004). Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? (Resumo online) *Immunological Reviews*, 201 (1), October 2004, pp 206–224. Acedido a 21 de Junho de 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.01052896.2004.00190.x/abstract;jsessionid=537949080F1D0E502250BA69E7628B3.d03t01>
- McMahon-Pratt, D., Kima, P.E. & Soong, L. (1998). *Leishmania* Amastigote Target Antigens: The Challenge of a Stealthy Intracellular Parasite. *Parasitology Today*, 14 (1), January 1998, pp. 31–34.
- Meireles, J. (2008). Capítulo VII: Terapêutica e profilaxia da leishmaniose canina. In Santos- Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., 2008, pp. 93-99
- Mello, G.B. (1940). Verificação da infecção natural do gato (*Felix domesticus*) por um protozoário do género *Leishmania*. *Brasil Médico*, 54, 180.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G. & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, 24 (8), August 2008, pp. 371–377.
- Mittal, P., Wijeyaratne, P. & Pandey, S. (2004). Status of Insecticide Resistance of Malaria, Kala-azar and Japanese Encephalitis Vectors in Bangladesh, Bhutan, India and Nepal (BBIN). Environmental Health Project, March 2004, Kathmandu, Nepal pp.14-15,44-48, 57.
- Morais, A.T., Durão, C., Soares, E., Lima, M., Monteiro, P., Soares, R. & Botto, S. (2008). Diagnóstico Analítico das Dependências: Centro de Respostas Integradas de Viseu. Acedido a 1 de Agosto de 2012, disponível em: http://www.idt.pt/PT/DelegacoesRegionais/Centro/Documents/Caracterizacao/2008/12/CRI%20de%20VISEU_Diagn%C3%B3stico%20Anal%C3%ADtico%20das%20Depend%C3%Aancias.pdf
- Moreira, M., Luvizotto, M., Garcia, J., Corbett, C. & Laurenti, M. (2007). Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*, 145 (3-4), April 2007, pp. 245–252.
- Mortarino, M., Franceschi, A., Mancianti, F., Bazzocchi, C., Genchi, C. & Bandi, C. (2004). Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania* (Resumo online). *Parassitologia*, June 2004, 46 (1-2), pp. 163-167. Acedido a 13 de Agosto de 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15305709>
- Muller, N., Welle, M., Lobsiger, L., Stoffel, M.H., Boghenbor, K.K., Hilbe, M., Gottstein, B., Frey, C.F. Geyer, C. & Wolf von Bomhard (2009). Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Veterinary Parasitology*, 166 (3-4), December 2009, pp. 346–351.
- Nasereddin, A., Salant, H. & Abdeen, Z. (2008). Feline leishmaniasis in Jerusalem: Serological investigation. *Veterinary Parasitology*, 158 (4), December 2008, pp. 364-369.
- Naucke, T.J. & Lorentz, S. (2012). First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors*, 5, 2012, 67.
- Navarro, J., Sánchez, J., Penafiel-Verdú, C., Buendia, A., Altimira, J. & Vilafranca, M (2010). Histopathological Lesions in 15 cats with Leishmaniose. *Journal of Comparative Pathology*, 143, pp. 297-302.

- Neto, L.S., Sobrinho, L.S.V., Martins, C.O., Machado, R.Z., Marcondes, M. & Felix de Lima, V.M. (2011). Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. *Veterinary Parasitology*, 177, pp. 374–377.
- OIE (2011). *Leishmaniosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Volume 1* (6th ed.). Paris, France. pp. 240-250.
- Oliveira, A.M., Diaz, S., Santos, C., Bourdeau, P. & Pereira da Fonseca, I. (2010). Geographical distribution, clinical presentation, treatment and prevention of canine leishmaniosis in Portugal: a 2007 field survey. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 109, pp. 21-29.
- Oliveira, T.S.O. (2011). Detecção de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Mycoplasma haemofelis* e *Leishmania infantum* em felinos errantes e a sua relação com a presença de retrovírus e com a sintomatologia manifestada. Tese de Mestrado Integradado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Olivier, M., Atayde, V.D., Isnard, A., Hassani, K. & Shio, M.T. (2012). *Leishmania* virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63 (Versão online). *Microbes and Infection* (2012). Acedido em 22 de Junho de 2012, disponível em: [10.1016/j.micinf.2012.05.014](http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.014)
- Onleish (2010). Observatório Nacional das Leishmanioses. Acedido em 14 de Julho de 2012, disponível em: <http://www.onleish.org/index.php>
- Otranto, D., Testini, G., Buonavoglia, C., Parisi, A., Brandonisio, O., Circella, E., Dantas-Torres, F. & Camarda, A. (2010). Experimental and field investigations on the role of birds as hosts of *Leishmania infantum*, with emphasis on the domestic chicken. *Acta Tropica*, 113 (1), January 2010, pp 80–83.
- Ozon, C., Marty, P., Pratlong, F., Breton, C., Blein, M., Lelièvre, A. & Haas, P. (1998). Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Veterinary Parasitology*, 75 (2-3), February 1998, pp. 273- 277.
- Passos, V.M.A., Lasmar, E.B., Gontijo, C.M.F., Fernandes, O. & Degraeve, W. (1996). Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91.
- Pennisi, M., Venza, M., Reale, S. & Vitale, F. (2004). Lo Giudice. S., Case Report Of Leishmaniasis In Four Cats. *Vet. Res. Commun.*, 28, pp. 363-366.
- Pennisi, M.G. (2002). A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In R. Killick-Kendrick (Ed.), *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum: Canine Leishmaniasis: moving towards a solution*. Sevilla, Spain, pp. 39-48.
- Pereira da Fonseca, I.M. & Villa de Brito, M.T. (2008). Capítulo VI: Diagnóstico. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., 2008, pp. 83-91.
- Pereira, A.R. (2003). Geografia física e ambiente: Diversidade do meio físico e recursos naturais. Tenedório, J.A. (2003). *Atlas da Área Metropolitana de Lisboa*. Acedido a 31 de Julho de 2012, disponível em: http://www.aml.pt/web/webstatic/actividades/smig/atlas/_docs/atlas_04.pdf

- Poli, A., Abramo, F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludovisi, A. & Mancianti, F. (2002). Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy, *Veterinary Parasitology*, 106 (3), June 2002, pp. 181-191.
- Quinnell, R. & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136 (14), pp. 1915-1934.
- Rivas, L., Moreno, J., Canavate, C. & Alvar, J. (2004). Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient? *TRENDS in Parasitology*, 20 (7), July 2004.
- Rodriguez, J., Arevalo, J., Chacon-Manrique De Lara, F., Fernandez, J.L., Boiso, A. & Villamandos, J. (2002). Evaluation of local immunoresponse in feline leishmaniasis. *Proceedings of the 27 WSAVA Congress: Oral Communications– Infectious diseases*, 3 a 6 October
- Rogers, M, Chance, M. & Bates P. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Veterinary Parasitology*, 124 (5), pp. 495-507
- Rolão, N., Martins, M.J., João, A. & Campino, L. (2005). Equine infection with *Leishmania* in Portugal (resumo online). *Parasite*, 12 (2), 2005 Jun, pp. 183-6. Acedido a 20 de Junho de 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15991833>
- Rolão, N., Cortes, S., Rodrigues, O.R. & Campino, L. (2004). Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction - enzyme linked immunosorbent assay. *Journal of Parasitology*, 90 (5), pp. 1150–1154.
- Romero, M.B., Crespo, A.E. & Llinares, M.G. (2012). Leishmaniose felina. *Argos: VBD Enfermedades transmitidas por vectores*, nº137, Abril 2012, pp. 46-47.
- Rosa, N.J.G.C. (2009). Rastreo de Dirofilariose e de Leishmaniose em Gatos da área Metropolitana de Lisboa. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Rossi, C.N., Nunes, C.M., Savani, E.S.M.M., Lima, V.M.F., Laurenti, M.D. & Marcondes, M. (2011). Feline Leishmaniasis in the Municipality of Aracatuba, São Paulo, Brazil. In *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings*.
- Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Gradoni, L. & Maroli, M. (2008). Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Topica*, 105, pp. 158-165.
- Rosypal, A.C., Zajac, A.M. & Lindsay, D.S. (2003). Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States (Resumo online). Acedido a 21 de Junho de 2012, disponível em: <http://www.mendeley.com/research/canine-visceral-leishmaniasis-and-its-emergence-in-the-united-states/#page-1>
- Rüfenacht, S., H. Sager, N. Muller, V. Schaerer, A. Heier, M.M. Welle & P.J. Roosie, (2005). Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland, *Vet. Rec.* 156, pp. 542–545.
- Sanches, A., Cardoso, C., Pereira, A. & Carvalho, J. (2009). Um caso de leishmaniose felina In *Proceedings of 18º Congresso Nacional da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários*

Especialistas em Animais de Companhia (APMVEAC) – Livro de Resumos: comunicações livres: painel (CD), Lisboa, 29-31 Maio 2009

- Savani, E.S.M.M., Camargo, M.C.G.O., Carvalho, M.R., D'Áudria, S.R.N., Zampieri, R.A. & Floeter-Winter, L.M. (2002). Primeiro caso de leishmaniose felina causada por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na América. In: Proceedings of Congresso Científico Anual do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 181. Disponível online em: <http://www.icb.usp.br/resumo/res-epi.html>.
- Schmidt, G.D. & Roberts, L.S. (2009). Chapter 4: Parasitic Protozoa: Form Function, and Classification. In Foundations of Parasitology (8th ed.), (pp. 43-56). New York, USA: The McGraw Hill Companies.
- Schmidt, G.D. & Roberts, L.S. (2009). Chapter 5: Kinetoplasta: Trypanosomes and Theirs Kin. In Foundations of Parasitology (8th ed.), (pp. 61-85). New York, USA: The McGraw Hill Companies.
- Schubach, T.M.P., Figueiredo, F.B., Pereira, S.A., Madeira, M.F., Santos, I.B., Andrade, M.V., Cuzzi, T., Marzochi, M.C.A & Schubach, A.O. (2004). American cutaneous Leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 98, 165-167.
- Sergent Ed. et Et., Lombard, J. & Quilichini, M. (1912). La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. Bulletin de Société de Pathologie Exotique, 5, 93-98.
- Sherry, K., Miro, G., Trotta, M., Miranda, C., Montoya, A. & Espinosa, C., *et al.* (2011). A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the Island of Ibiza (Spain) (Resumo Online). Vector Borne Zoonotic Diseases. Acedido a 27 de Junho de 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20804432>
- Silva, A.B.M., Cândido, C.D.S., Pereira, D.P., Brazil, R.P. & Carreira, J.C.A. (2008). The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brasil. Acta Tropica, 105, pp. 92-94.
- Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M.A., Xavier, E.F., Nascimento & Santos R.L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. Veterinary Parasitology 160 (1-2), March 2009, pp. 55–59.
- Silveira Neto, L., Sobrinho, L.S., Martins, C.O., Machado, R.Z., Marcondes, M. & Lima V.M. (2011). Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. Veterinary Parasitology, 177(3-4), May 2011, pp.374-377.
- Simões-Mattos, L., Mattos, M.R.F., Teixeira, M.J., Oliveira-Lima, J.W., Bevilaqua, C.M.L., Prata-Júnior, R.C., Holanda, C.M., Rondon, F.C.M., Bastos, K.M.S., Coelho, Z.C.B., Coelho, I.C.B. Barral, A. & Pompeu, M.M.L. (2005). The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. Veterinary Parasitology, 127, pp. 199–208.
- Simões-Matos, L., Bevilaqua, C., Mattos, M. & Pompeu, M. (2004). Feline Leishmaniasis: Uncommon or Unknown? Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, 99 (550), pp. 79- 87.
- Sobrinho, L.S.V., Rossi, C.N., Vides, J.P., Braga, E.T., Gomes, A.A.D., Lima, V.M.F., Perri, S.H.V., Generoso, D., Langoni H., Leutenegger, C., Biondo, A.W., Laurenti, M.D. & Marcondes, M.

- (2012). Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 187 (1-2), June 2012, pp. 302-306.
- Sobrinho, L.S.V., Rossi, C.N., Laurenti, M.D, Lima, V.M.F., Costa, T.A.C., Vides, J.P., Gomes, A.A.D., Braga, E.T. & Marcondes, M. (2010). Absence of Association Between *Leishmania* sp, FIV and FeLV Infections, in Cats From an Endemic Area for Visceral Leishmaniasis in Brazil (resumo online). In Proceedings of ACVIM Forum & Canadian Veterinary Medical Association Convention, Montreal, Canada. Acedido em 15 de Junho de 2012, disponível em: <http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=acvim2010&PID=pr55567&O=VIN>
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva G. & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine Leishmaniosis. *Parasites & Vectors* 2011, 4:86.
- Solano-Gallego, L.K., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2), pp. 1-18.
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M. & Alberola, J. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg*, 76, pp. 676–680.
- Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S. & Sundar, S. (2011). Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105 (1), January 2011, pp. 1-6.
- Srividya, G., Kulshrestha, A., Singh, R. & Salotra, P. (2012). Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitology Research*, 110 (3), pp. 1065-1078.
- Tabar, M.D., Altet, L., Francino, O., Sánchez, A., Ferrer, L. & Roura, X. (2008). Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona área (Spain). *Veterinary Parasitology*, 151, pp.332-336.
- Tiuman, T.S., Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Filho, B.P.D. & Nakamura, C.V. (2011). Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, 15 (8), August 2011, pp. 525–532.
- Tomás, A. & Freitas Romão, S. (2008). Capítulo I: Biologia do parasita. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.) *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., pp.7-26.
- Vaz, Y., Almeida, V., Pereira da Fonseca, I., Duarte, A., Madeira de Carvalho, L., Meireles, J., Fazendeiro, M. (2005). Estudo de doenças transmissíveis em populações de gatos errantes. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. Ano 33°. SUPL. 129- 130, Jan-Jun. 2005: pp. 9-10
- Vides, J.P., Schwardt, T.F., Sobrinho, L.S., Marinho, M., Laurenti, M.D., Biondo, A.W., Leutenegger, C. & Marcondes, M. (2011). *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 178 (1-2), May 2011, pp. 22-28.

- Vita, S., Santori, D., Aguzzi, I., Petrotta, E. & Luciani, A. (2005). Feline Leishmaniasis and Ehrlichiosis: Serological Investigation in Abruzzo Region. *Veterinary Research Communications*, 29 (2), pp. 319–321.
- World Health Organization (WHO) (2010). Control of the leishmaniasis: Report of the Who Expert Committee on the Control of Leishmaniasis (versão online). Acedido a 7 de Junho de 2012, disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf
- World Health Organization (WHO) (2010). First WHO report on neglected tropical diseases (versão online). Acedido a 7 de Junho de 2012, disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf
- Zárate-Ramos, J.J., Arbea-Sarasa, I., Gómez-Ochoa, P., Castillo-Hernández, J.A., García-Salinas, M.J. & Morales-Amella, M.J. (2002). Serological evidence of leishmaniasis in cats in Aragon, Spain. In: *Proceedings of the 27th WSAVA Congress*, Granada, Spain.

V – ANEXOS

Anexo I – Inquérito realizado aos proprietários dos felinos domésticos de Lisboa e Viseu

Inquérito no âmbito da tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária – Contribuição para o estudo da prevalência da infecção por *Leishmania infantum* em Gatos errantes e Gatos domésticos nos distritos de Lisboa e Viseu



A – IDENTIFICAÇÃO

1. Nome do Animal: _____ 2. Idade: _____
3. Sexo: Feminino ☐ Masculino ☐ 4. É um animal castrado? Sim ☐ Não ☐
5. Raça: _____ 6. Tipo de pelagem: Curta ☐ Comprida ☐
7. Nome do Proprietário: _____ TLF: _____
8. Morada: _____
9. Proveniência do gato? Loja ☐ Criador ☐ Atil ☐ a ☐
- Nascido na casa do proprietário ☐ Recido por particular ☐
10. Desde quando está com o proprietário? _____

B- HABITAT

1. Onde vive o seu gato? _____
2. Tem acesso à rua? Sim ☐ Não ☐
- 2.1. Se sim, em que alturas do dia? De manhã ☐ De tarde ☐ noite ☐
- Sempre ☐
3. O seu gato dorme dentro de casa? Sim ☐ Não ☐ 3.1. Se não, onde? _____
4. Co-habita com outros animais? Sim ☐ Não ☐
- 4.1. Se sim, qual ou quais? Cão ☐ Gato ☐ Outros ,quais? _____
5. Há crianças ou idosos no agregado familiar? Sim ☐ Não ☐
6. O gato costuma acompanhar os donos nos fins-de-semana ou férias?
- Sim ☐ Não ☐
- 6.1. Se sim, para onde se costumam deslocar? Cidade ☐ ampo ☐ a ☐

C- SAÚDE

1. Realiza algum tipo de profilaxia para ectoparasitas? Sim ☐ Não ☐

1.1. Se sim, com que frequência? _____

1.2. Qual o produto/Substância activa? _____ **1.3. Se não, porquê?**

Razões económicas ☐ Animal de apartamento ☐ Tem reacções secundárias ,quais?

2. Realizou algum teste de FIV e FeLV ao seu animal? Sim ☐ Não ☐

2.1. Se sim, qual o resultado? FIV ☐ FeLV ☐

3. O seu gato sofre de alguma doença concomitante? Sim ☐ Não ☐

3.1. Se sim, qual ou quais? _____

3.2. Quando surgiram? _____

3.3. Está a tomar alguma medicação? Qual ou quais? _____

4. O seu animal apresenta algum sinal de possível Leishmaniose?

Nódulos ☐ Feridas de difícil cicatrização ☐ Inchaço sem causa aparente ☐

Outros, quais? _____

Obrigada pela sua colaboração!

Joana Garrido

Anexo II - Resultados de todos os exames de diagnóstico às quais foram submetidas as amostras dos gatos errantes e domésticos de Lisboa.

Gato	IFI		qPCR		FIV	FeLV	Hemólise do soro
	Diluição 1:40	Diluição 1:80	Resultados	Carga Parasitária (moléculas)			
D1	P	N	-	169,17	-	-	+
D2	N	-	N		-	-	++
D3	N	-	N		-	-	0
D4	N	-	P		N	N	+++
D5	P	N	N		N	N	0
D6	N	-	N		-	-	++
D7	N	-	N		-	-	+++
D8	N	-	N		-	-	+
D9	N	-	N		-	-	++
D10	P	N	-		N	N	++
D11	N	-	N	489,01	-	-	0
D12	N	-	N		-	-	0
D13	N	-	N		-	-	0
D14	N	-	N		-	-	0
D15	N	-	N		-	-	++
D16	N	-	P		N	N	+
D17	N	-	N		-	-	+
D18	N	-	N		-	-	0
D19	N	-	N		-	-	+++
D20	P	N	N		N	N	+
E21	N	-	N	170,53	-	-	++
E22	N	-	N		-	-	0
E23	N	-	N		-	-	+
E24	N	-	N		-	-	+
E25	N	-	N		-	-	+
E26	N	-	N		-	-	+++
E27	N	-	N		-	-	0
E28	N	-	P		N	N	++
E29	N	-	N		-	-	+
E30	N	-	P		N	N	+++
E31	N	-	N	377,64	-	-	0
E32	N	-	N		-	-	+
E33	P	N	N		N	N	0
E34	N	-	N		-	-	+++
E35	N	-	N		-	-	0
E36	N	-	N		-	-	+++
E37	N	-	N		-	-	++
E38	N	-	N		-	-	+++
E39	N	-	N		-	-	+++
E40	N	-	N		-	-	0

Legenda: D: doméstico; E: Errante; P: positivo; N: Negativo; - Não efectuado; 0: sem hemólise; +: Ligeiramente hemolisado; ++: bastante hemolisado; +++: fortemente hemolisado

Anexo III - Resultados de todos os exames de diagnóstico às quais foram submetidas as amostras dos gatos errantes e domésticos de Viseu.

Gato	IFI		qPCR		FIV	FELV	Hemólise do soro
	Diluição 1:40	Diluição 1:80	Resultados	Carga Parasitária (moléculas)			
D41	N	-	N	-	-	-	+
D42	N	-	-	-	-	-	0
D43	N	-	P	426,22	N	N	0
D44	P	N	N	-	N	P	+++
D45	P	N	N	-	N	N	0
D46	P	N	N	-	N	P	+++
D47	N	-	N	-	-	-	+++
D48	N	-	N	-	-	-	++
D49	N	-	-	-	-	-	+
D50	N	-	N	-	-	-	0
D51	N	-	N	-	-	-	+
D52	N	-	N	-	-	-	+
D53	P	N	N	-	N	N	++
D54	N	-	N	-	-	-	0
D55	N	-	N	-	-	-	0
D56	N	-	P	338,64	N	N	+
D57	P	N	N	-	N	N	0
D58	N	-	N	-	-	-	+
D59	N	-	-	-	-	-	+++
D60	N	-	-	-	-	-	0
E61	P	N	N	-	N	N	0
E62	N	-	N	-	-	-	++
E63	N	-	P	249,78	P	N	+
E64	P	N	N	-	N	N	++
E65	P	N	N	-	N	N	0
E66	P	N	N	-	N	N	+
E67	N	-	N	-	-	-	0
E68	N	-	N	-	-	-	0
E69	N	-	-	-	-	-	+
E70	P	N	N	-	N	N	++
E71	N	-	N	-	-	-	0
E72	N	-	-	-	-	-	+
E73	N	-	N	-	-	-	+++
E74	N	-	N	-	-	-	+
E75	N	-	N	-	-	-	+
E76	N	-	N	-	-	-	0
E77	N	-	-	-	-	-	0
E78	N	-	N	-	-	-	+
E79	N	-	N	-	-	-	++
E80	N	-	P	217,37	N	N	+

Legenda: D: doméstico; E: Errante; P: positivo; N: Negativo; - Não efectuado; 0: sem hemólise; +: Ligeiramente hemolisado; ++: bastante hemolisado; +++: fortemente hemolisado

Anexo IV - Resultados Estatísticos aplicados à técnica de IFI.

	IFI	
	X^2	p
Idade	0,917	0,421
Raça	0,885	0,308
Proveniência do animal	0,520	0,437
Tipo de Pelagem	0,861	0,615
Habitat	0,758	0,809
Contacto com outros animais	0,263	0,269
Profilaxia	0,009	0,003
Idosos e/ou crianças no habitat	0,567	0,729
Doenças concomitantes	0,830	0,287

Legenda: X^2 : Teste de Qui-Quadrado; p : índice de significância,
IFI: Imunofluorescência Indirecta

Anexo V - Resultados Estatísticos aplicados à técnica de qPCR

	qPCR	
	X^2	p
Idade	0,514	0,208
Raça	0,400	0,705
Proveniência do animal	0,221	0,992
Tipo de Pelagem	0,509	0,338
Habitat	0,668	0,392
Contacto com outros animais	0,264	0,145
Profilaxia	0,447	0,488
Idosos e/ou crianças no habitat	0,427	0,220
Doenças concomitantes	0,417	0,745

Legenda: X^2 : Teste de Qui-Quadrado; p : índice de significância,
qPCR: Reacção em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

Anexo VI - Informação relativa dos gatos com resultados positivos nas técnicas de IFI e qPCR.

Gato			Informação Relativa ao Animal					
		Teste de Diagnóstico Positivo	Sexo	Idade	Raça	Pelagem	Habitat	Doenças Concomitantes
AML	D1	IFI (Diluição 1:40)	MC	11	EC	C	Interior	Saudável
	D4	qPCR (CP - 169,17)	M	17	EC	c	Misto	Fibrossarcoma
	D5	IFI (Diluição 1:40)	FE	5	EC	c	Misto	Insuficiência Hepática
	D10	IFI (Diluição 1:40)	M	2	Ind	C	Misto	Cálculos Renais
	D16	qPCR (CP - 489,01)	F	2	Ind	c	Interior	Pancreatite
	D20	IFI (Diluição 1:40)	MC	11	Persa	C	Interior	Saudável
	E28	qPCR (CP- 170,53)	M	Jovem	-	-	Exterior	-
	E30	qPCR (CP- 377,64)	M	Jovem	-	-	Exterior	-
	E33	IFI (Diluição 1:40)	F	Jovem	-	-	Exterior	-
Viseu	D43	qPCR (CP- 426, 32)	MC	10	Ind	c	Interior	Saudável
	D44	IFI (Diluição 1:40)	MC	2	Ind	c	Misto	FeLV
	D45	IFI (Diluição 1:40)	F	12	Persa	C	Interior	Doença Renal Crônica
	D46	IFI (Diluição 1:40)	MC	4	Ind	c	Misto	FeLV, Abscesso traumático na região cervical
	D53	IFI (Diluição 1:40)	F	6	EC	c	Interior	Saudável
	D56	qPCR (CP- 338,64)	FC	5	EC	C	Interior	Saudável
	D57	IFI (Diluição 1:40)	MC	12	EC	c	Misto	Saudável
	E61	IFI (Diluição 1:40)	FC	Jovem Adulto	-	-	Exterior	-
	E63	qPCR (CP- 249, 78)	M	Jovem Adulto	-	-	Exterior	FIV
	E64	IFI (Diluição 1:40)	FC	Jovem Adulto	-	-	Exterior	-
	E65	IFI (Diluição 1:40)	FC	Jovem Adulto	-	-	Exterior	-
	E66	IFI (Diluição 1:40)	FC	Jovem Adulto	-	-	Exterior	-
	E70	IFI (Diluição 1:40)	FC	Jovem Adulto	-	-	Exterior	-
	E80	qPCR (CP- 217, 37)	FC	Jovem Adulto	-	-	Exterior	-

Legenda: D-Doméstico; E- Errante; IFI- Imunofluorescência Indirecta; qPCR- Reacção em Cadeia da Polimerase em tempo real; CP- Carga Parasitária; M- Macho inteiro; MC- Macho castrado; F- Fêmea inteira; FE- Fêmea esterilizada; EC- Europeu comum; Ind- Indeterminada; C- comprida; c- curta; FeLV- Vírus da Leucemia Felina; FIV- Vírus da Imunodeficiência Felina; AML- Área Metropolitana de Lisboa; - sem informação

Anexo VII – Resumo para o XVI Congresso da Sociedade Portuguesa de Parasitologia

COMPARAÇÃO DO QUADRO DA INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* EM GATOS DOMÉSTICOS E ERRANTES PROVENIENTES DOS DISTRITOS DE LISBOA E VISEU*

Garrido, J., Sales Luís, J., Duarte, A., Tavares, L., Pereira da Fonseca, I.

*CIISA, Fac Med Vet, Univ Tecn Lisboa, Av. da Universidade Técnica de Lisboa, 1300-477 Lisboa, Portugal

INTRODUÇÃO: A Leishmaniose visceral zoonótica causada por *Leishmania infantum* é considerada uma doença endémica em Portugal. Sabe-se que o cão é o principal hospedeiro reservatório, no entanto, o papel do gato (*Felis catus*) na epidemiologia da doença têm vindo adquirir um interesse crescente^{1,2,3}.

Com o objectivo de avaliar a prevalência de *L. infantum* em felinos, foi realizado um rastreio molecular e serológico em duas populações de gatos domésticos e errantes dos distritos de Lisboa (Área Metropolitana da Lisboa- AML) e de Viseu

MATERIAL E MÉTODOS: Amostras de sangue total e de soro provenientes de gatos domésticos (20 da AML e 20 do distrito de Viseu) e de gatos errantes (20 da AML e 20 do distrito de Viseu), num total de 80 animais com idade compreendida entre 1 e 22 anos (Média \approx 8 anos), foram submetidas às técnicas de Imunofluorescência Indireta - IFI para pesquisa de anticorpos, com um cutoff de 1:40.e a PCR quantitativo – qPCR para deteção e quantificação de ADN de *L. infantum*.

Nos animais positivos por qualquer das técnicas, foi avaliada a presença de anticorpos anti-FIV e de antígeno do FeLV, por ELISA indireta e em *sandwich*, respetivamente.

RESULTADOS: Em 9/40 (22,5%) dos gatos domésticos (4 da AML e 5 de Viseu) e em 6/40 (15%) dos gatos errantes (1 da AML e 5 de Viseu) foram detetados anticorpos anti-*Leishmania*, embora com baixo título. Em 10% (4/40) dos felinos domésticos (2 da AML e 2 de Viseu) e em 10% dos felinos errantes (2 da AML e 2 de Viseu) verificou-se a amplificação de ADN do protozoário, com uma carga parasitária entre 100 a 500 cópias alvo. Nenhum dos animais seropositivos apresentou simultaneamente positividade pela técnica de qPCR e nenhum animal positivo a ADN de *L. infantum* revelou seropositividade. Quanto à deteção de anticorpos anti-FIV em amostras positivas para *Leishmania*, uma única amostra foi positiva. Em relação à pesquisa de antígeno FeLV, dois gatos apresentaram resultados positivos. A associação da infeção por *Leishmania* e por estes retrovírus imunossupressores não foi estatisticamente significativa ($p > 0,005$).

CONCLUSÃO: No presente trabalho, e embora não tenha sido possível fazer o seguimento clínico e laboratorial na maioria destes gatos, os resultados serológicos, sugerem a presença de infeções por *L. infantum* antigas ou muito recentes, devido à baixa concentração de anticorpos detectada, embora a hipótese de reações cruzadas com outros microrganismos ainda não determinados, não possa ser afastada. Os resultados moleculares indicam uma reduzida carga parasitária insuficiente para desencadear a doença.

Na AML registaram-se seroprevalências superiores para os gatos domésticos quando comparados com os gatos errantes. O facto de serem animais domésticos com acesso ao exterior, e de possuírem uma média de idades de 8 anos, favorece uma maior exposição aos flebotómios infetados, podendo justificar os resultados. Quanto às menores taxas de anticorpos observadas nos gatos errantes deste estudo, podem estar associadas ao facto de serem animais mais jovens (média de idades \approx 4 anos), que não contataram com tantas épocas de transmissão do parasita como os gatos domésticos. Por outro lado, como estes animais vivem na rua e estão expostos a um maior número de agentes infecciosos e de agressões ambientais, poderão ter desenvolvido resistências naturais que lhes conferiram uma imunidade mais sólida contra a infeção por *Leishmania*.

Considerando o aumento de casos de Leishmaniose felina em Portugal, os Médicos Veterinários assim como os proprietários destes animais devem ser alertados para esta nova realidade no panorama da leishmaniose animal.

REFERÊNCIAS:

- 1- Maia, C. & Campino, L. (2011). A importância do gato doméstico (*Felis catus domesticus*) na epidemiologia da leishmaniose zoonótica. *Veterinary Medicine*, 13 (76), pp. 46-49.
- 2- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E. & Campino, L. (2010). Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 174, pp. 336–340.
- 3- Simões-Matos, L., Bevilaqua, C., Mattos, M. & Pompeu, M. (2004). Feline Leishmaniasis: Uncommon or Unknown? *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99 (550), pp. 79- 87.

*Trabalho financiado pelo Projeto PTDC/CVT/118566/2010 da FCT e pelo CIISA/FMV.